

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



PCT

**(43) Date de la publication internationale  
17 février 2005 (17.02.2005)**

**(10) Numéro de publication internationale  
WO 2005/014581 A2**

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :**  
**C07D 401/14**

**(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG [FR/FR]; 4, rue Blaise Pascal, F-67000 Strasbourg (FR).**

**(22) Date de dépôt international :** 20 juillet 2004 (20.07.2004)

**(72) Inventeurs; et**

**(25) Langue de dépôt :** français

**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** **CHARBONNIERE, Loïc [FR/FR]; 1, Impasse des Tulipes, F-67720 Weyersheim (FR). ZIESSEL, Raymond [FR/FR]; 3, rue des Cailles, F-67400 Souffelweysheim (FR). WEIBEL, Nicolas [FR/FR]; 11, rue Messimy, F-68000 Colmar (FR). RODA, Aldo [IT/IT]; via Saragossa 18, I-40123 Bologna (IT). GUARDIGLI,**

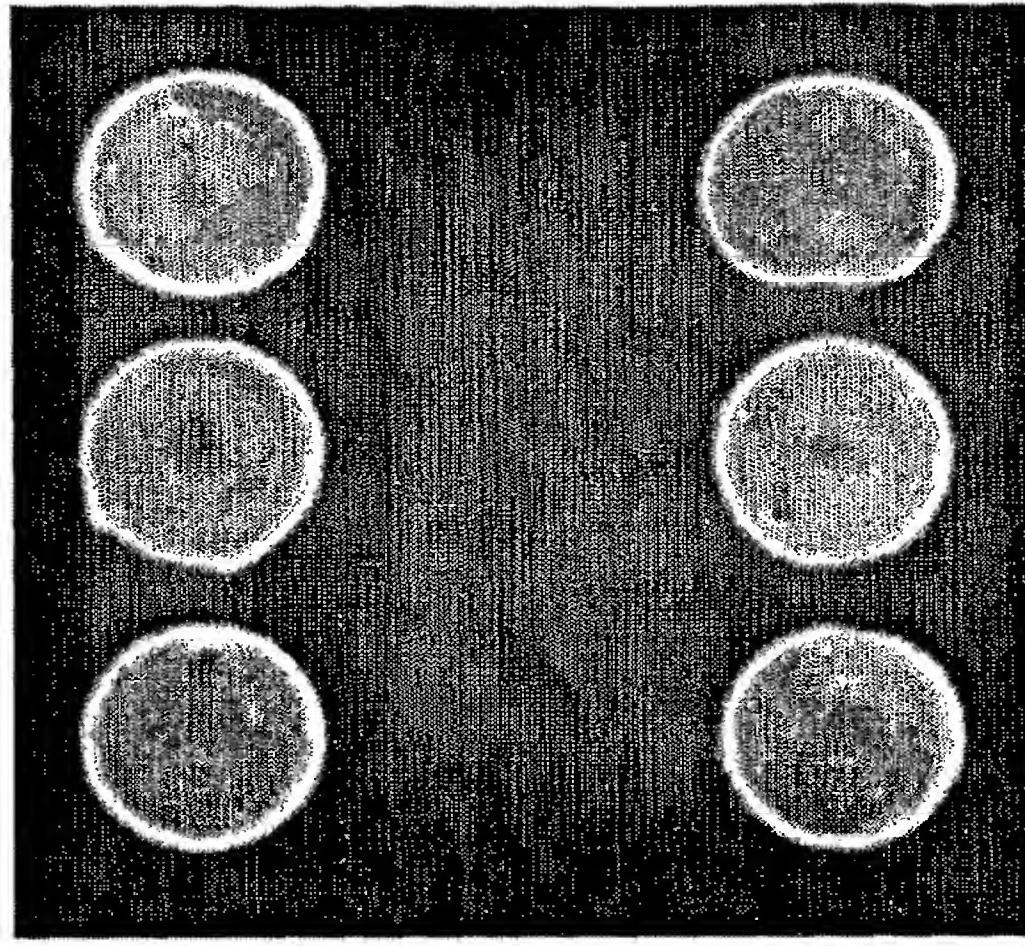
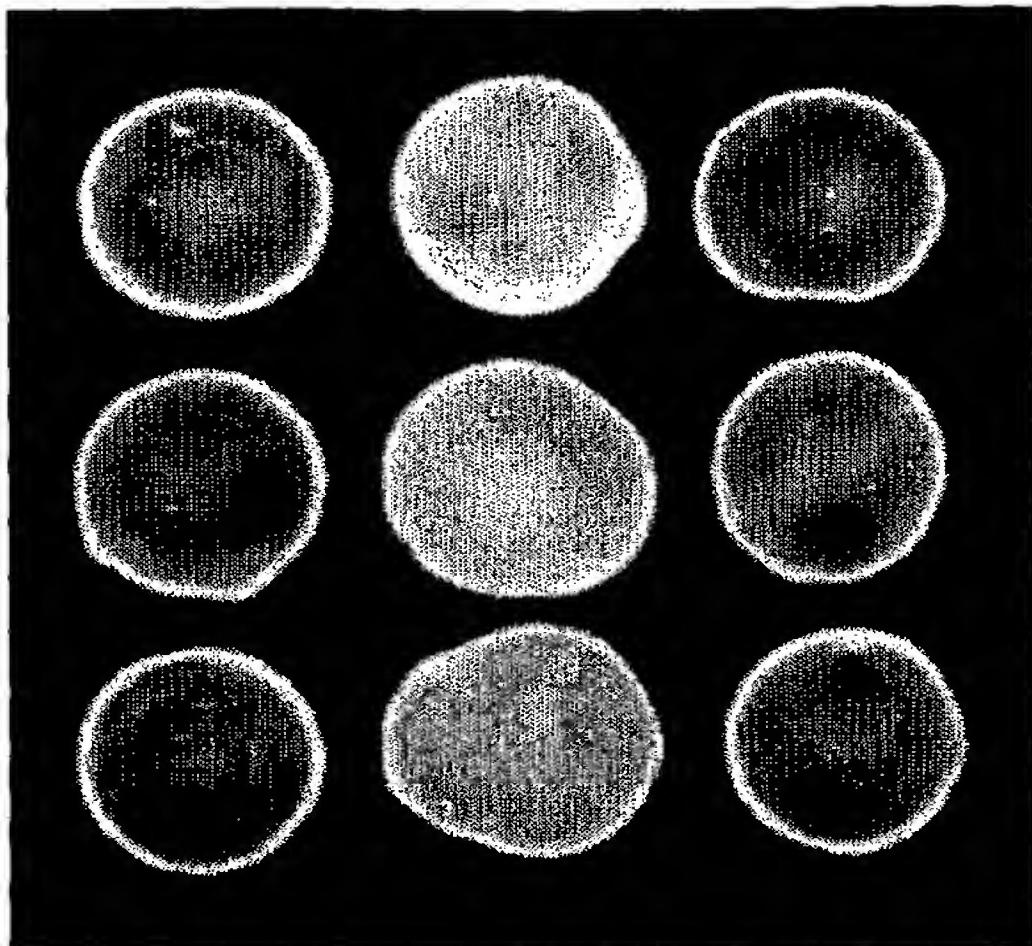
**(26) Langue de publication :** français

*[Suite sur la page suivante]*

**(30) Données relatives à la priorité :**  
0309158                    25 juillet 2003 (25.07.2003) FR

**(54) Title:** LANTHANIDE COMPLEXES PREPARATION AND USES THEREOF

**(54) Titre :** COMPLEXES DE LANTHANIDES, LEUR PRÉPARATION ET LEURS UTILISATIONS.



**WO 2005/014581 A2**

**(57) Abstract:** The invention relates to compounds and the complexes formed thereby with a lanthanide and use of the complexes for fluorescence or NMR-imagery marking. The complex comprises an Ln ion and a R<sup>2</sup> C(X R<sup>1</sup>) (R<sup>3</sup>) NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> ligand, where R<sup>1</sup> is a functional group, X is a single bond or a hydrocarbon chain, comprising at least one alkylene or alkenylene group with optionally at least one heteroatom or an arylene, R<sup>2</sup> is an anionic group A<sup>2</sup>, or a C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylene or alkenylene with at least one such group A<sup>2</sup> and optionally comprising at least one heteroatom, R<sup>3</sup> is H or a C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alkylene or alkenylene, optionally comprising at least one heteroatom and optionally having at least one anionic group A<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> is a light-absorbing substituent forming cyclic chelates with Ln and R<sup>5</sup> is a substituent forming cyclic chelates with Ln.

**(57) Abrégé :** L'invention concerne des composés, les complexes qu'ils forment avec un lanthanide, et l'utilisation des complexes pour le marquage par fluorescence ou l'imagerie par RMN. Le complexe est constitué par un ion Ln et un ligand R<sup>2</sup> C(X R<sup>1</sup>) (R<sup>3</sup>) NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>. R<sup>1</sup> est un groupe fonctionnel, X est une simple liaison ou une chaîne hydrocarbonée constituée par au moins un groupe alkylène ou alkényle comprenant éventuellement au moins un hétéroatome, ou un arylene. R<sup>2</sup> est un groupe anionique A<sup>2</sup>

*[Suite sur la page suivante]*



**Massimo** [IT/IT]; via Sauro Babini 98, I-48010 Roncal- ceci (IT).

(74) **Mandataires :** SUEUR?, Yvette? etc.; 109, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).

(81) **États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

## Complexes de lanthanides, leur préparation et leurs utilisations

La présente invention concerne des composés capables de former des complexes avec les lanthanides, les complexes obtenus et leurs utilisations.

Les marqueurs radioactifs ont été largement utilisés 5 dans le domaine de l'imagerie médicale et de l'immunologie. En raison des inconvénients qu'ils présentent, ils ont été remplacés en grande partie par des marqueurs fluorescents.

Cependant l'utilisation des marqueurs fluorescents présente quelques inconvénients, notamment dus à l'auto-fluorescence des milieux biologiques étudiés et à la diffusion de lumière dans les appareillages. Les complexes d'ions lanthanides ont été proposés pour permettre une acquisition en temps résolu qui supprime ces inconvénients. Pour être utilisé comme marqueur luminescent en temps résolu, un complexe 10 d'ion lanthanide doit présenter de nombreuses caractéristiques, parmi lesquelles les plus importantes sont l'hydrophobicité, la stabilité dans l'eau, la présence de chromophores capables de générer l'effet d'antenne (Sabbatini, N. et al. Coord. Chem. Rev. 1990, 123, 201), de bonnes propriétés 15 photo-physiques (absorption élevée, excitation dans une gamme énergétique facilement accessible, temps de vie de l'état excité élevé et rendement quantique de luminescence élevé) et une fonction réactive qui permet un greffage covalent.

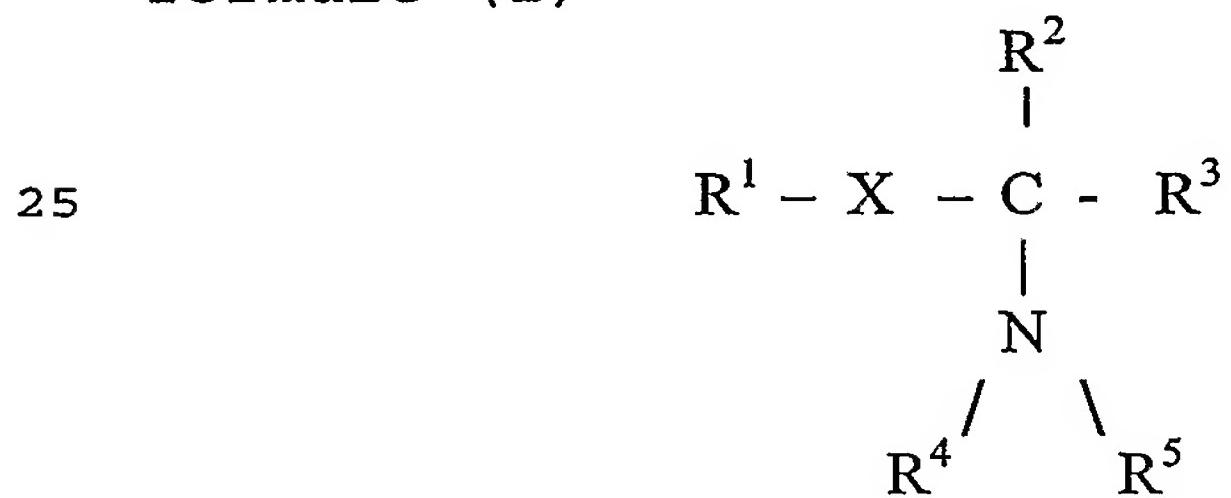
Les composés actuellement proposés possèdent rarement 20 la totalité de ces critères. Par exemple, les premiers complexes développés par la firme Wallac Oy sous l'appellation Delfia Chelate (Hemmila, I. et al. Anal. Biochem. 1984, 137, 335) ne possèdent pas de bonnes propriétés photo-physiques et il est nécessaire de procéder à une étape d'extraction du 25 lanthanide pour mesurer sa luminescence. Les composés développés par CIS Bio international sont des cryptates qui nécessitent l'utilisation d'anions fluorures pour augmenter la luminescence (Hemmila, I. et al. Drug Discovery Today, 1997, 2, 373). La stabilité des composés pose également de

graves problèmes. Ainsi les composés développés par CyberFluor sous le nom de BCPDA ne forment des complexes stables luminescents qu'à fortes concentrations (Marriott, G. et al., Biophysical Journal, 1994, 67, 957).

5 Des complexes de lanthanide, notamment de gadolinium, ont été utilisés comme agents de relaxation ou de contraste pour l'imagerie médicale par RMN (Caravan, P. et al. Chem. Rev. 1999, 99, 2293). Cette utilisation est permise par le fait que la première sphère de coordination du lanthanide 10 n'est pas complètement saturée par le ligand en solution aqueuse, des molécules d'eau pouvant alors compléter la sphère de coordination.

Le but de la présente invention est de proposer des complexes de lanthanide qui présentent des propriétés 15 améliorées par rapport aux complexes de lanthanide de l'art antérieur. C'est pourquoi l'invention a pour objet de nouveaux composés, leur utilisation pour la préparation de complexes avec des ions lanthanides, ainsi que l'utilisation 20 des complexes obtenus comme marqueurs fluorescents, comme agents de relaxation pour la RMN, ou pour l'imagerie RMN.

Un composé selon la présente invention répond à la formule (I)



30 dans laquelle

- $R^1$  est un groupe fonctionnel capable de réagir avec les fonctions présentes sur les protéines, les anticorps ou sur des matériaux minéraux ou organiques ;

- $X$  représente une simple liaison ou une chaîne hydrocarbonée constituée par au moins un groupe choisi parmi les groupes alkylènes et les groupes alkénylènes qui comprennent éventuellement au moins un hétéroatome, et parmi les groupes arylènes ;
- $R^2$  est un groupement anionique à pH

neutre A<sup>2</sup> ou un groupe alkylène ou alkénylène ayant de 1 à 4 atomes de carbone et portant au moins un tel groupement A<sup>2</sup>, ledit groupe alkylène ou alkénylène comprenant éventuellement au moins un hétéroatome dans la chaîne ;

5 - R<sup>3</sup> représente H ou un groupe alkylène ou alkénylène ayant de 1 à 5 atomes de carbone et contenant éventuellement au moins un hétéroatome dans la chaîne, ledit groupe portant éventuellement au moins un groupement anionique à pH neutre A<sup>3</sup> ;

10 - R<sup>4</sup> est un groupement répondant à la formule -(C)<sub>n</sub>-C-Z<sup>1</sup>-C-C-Z<sup>2</sup>-C-A<sup>4</sup> dans laquelle n est égal à 1 ou 2, Z<sup>1</sup> et Z<sup>2</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre un hétéroatome choisi parmi O et N, l'un au moins étant un atome d'azote qui fait partie d'un hétérocycle aromatique avec les 15 deux atomes de carbone qui l'entourent, et A<sup>4</sup> est un groupe qui est anionique à pH neutre dans lequel l'atome portant la charge anionique est en position  $\gamma$  par rapport à Z<sup>2</sup> ;

- R<sup>5</sup> est un groupement choisi parmi les groupements définis pour R<sup>4</sup> ou parmi les chaînes hydrocarbonées 20 -C-C-E<sup>1</sup>-C-C-E<sup>2</sup>-C-A<sup>5</sup> dans lesquelles E<sup>1</sup> et E<sup>2</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre un hétéroatome choisi parmi O et N, et A<sup>5</sup> est un groupe qui est anionique à pH neutre dans lequel l'atome portant la charge anionique est en position  $\gamma$  par rapport à E<sup>2</sup>.

25 L'hétéroatome des substituants X, R<sup>2</sup> et R<sup>3</sup> peut être notamment O ou N.

Le substituant R<sup>1</sup> peut être choisi par exemple parmi les groupes amino, thio, cyano, isocyano, acridinyle, hydrazino, halogénoacétate, anhydride, triazo, carbonyle, nitrobenzoyle, sulfonyle, thionyle, halogénure, époxyde, aldéhyde, imidazole, hydroxyphényle, mercapto, ester N-succinimique, ester N-sulfosuccinimique, maléimido, hydroxyle, carboxyle, thiocyano, et isothiocyano. Les groupes amino, thio, carboxyle, maléimido, ester N-succinimidique, ester N-sulfosuccinimidique et isothiocyano sont préférés.

Lorsque le groupement X est un groupement alkylène ou alkénylène, il a de préférence de 1 à 10 atomes de carbone.

Lorsque X est un groupement arylène, il a de préférence de 5 à 10 atomes de carbone. Par groupe arylène, on entend dans le présent texte, un groupe comprenant un noyau aromatique unique ou plusieurs noyaux aromatiques condensés ou non, 5 le(s) dit(s) noyau(x) portant éventuellement un ou plusieurs groupements hydrocarbonés aliphatiques. A titre d'exemple de groupes arylènes, on peut citer les groupes  $-C_6H_4-$ ,  $-CH_2-C_6H_4-CH_2-$ ,  $-C_6H_4-CH_2-$ ,  $-C_6H_4-CH_2-C_6H_4-$ ,  $-C_6H_3(CH_3)-$ . X est avantageusement choisi parmi une liaison simple ou un 10 groupement alkylène ou alkénylène ayant 2 ou 3 atomes de carbone.

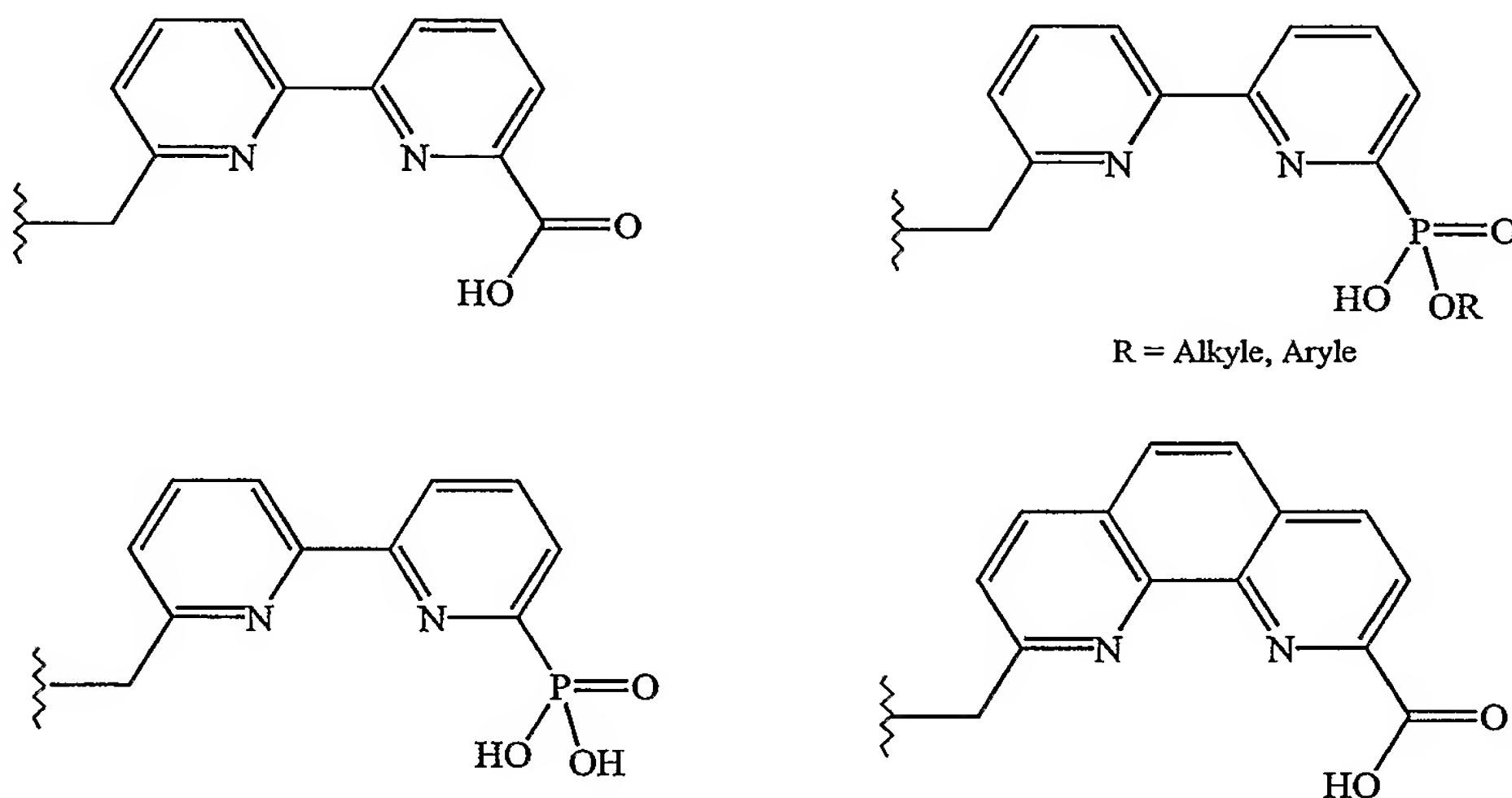
Le substituant R<sup>2</sup> est de préférence un groupe A<sup>2</sup>.

Le substituant R<sup>3</sup> est de préférence H ou un alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>3</sub>.

15 Dans les composés de la présente invention, chacun des substituants R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> est un substituant monovalent. Les substituants R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> ne forment pas ensemble un groupe divalent.

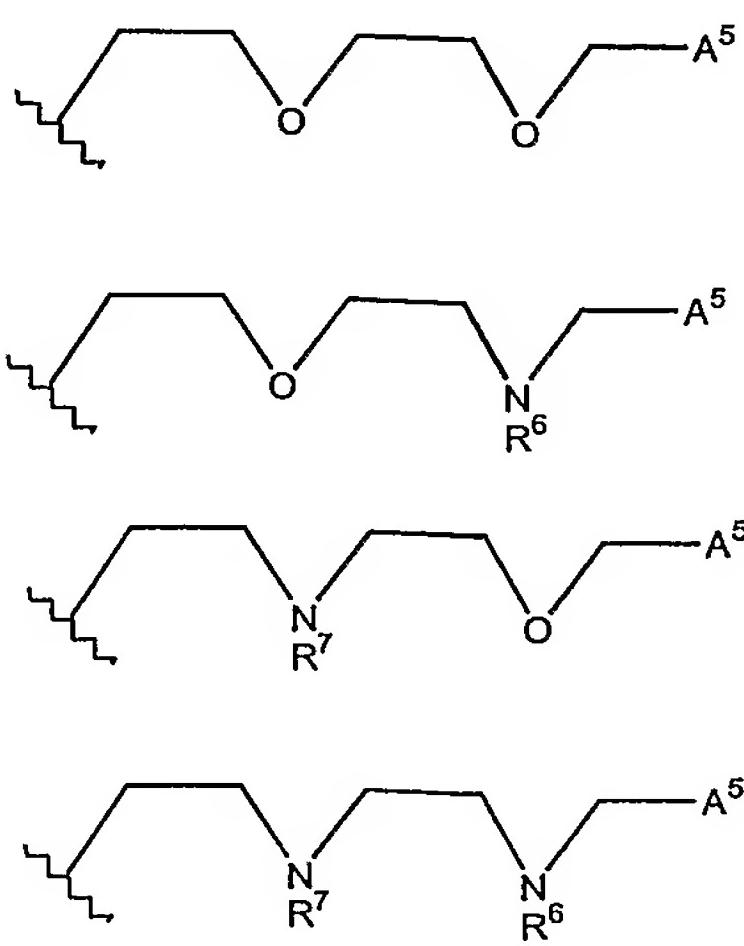
Le substituant R<sup>4</sup> est un substituant qui a des propriétés d'absorption de lumière et qui permet de former trois cycles chélates avec un lanthanide. Les substituants R<sup>4</sup> dans lesquels n est égal à 1 sont préférés. Comme exemple de substituant R<sup>4</sup> dans lequel l'un seul parmi Z<sup>1</sup> et Z<sup>2</sup> est un atome d'azote qui fait partie d'un hétérocycle aromatique, on 20 peut citer les substituants dans lesquels l'un des segments  $-C-Z^i-C-$  fait partie d'un groupe hétérocyclique choisi parmi les groupes pyridyle, pyrimidinyle, quinolyle et isoquinolyle. Les substituants R<sup>4</sup> dans lesquels Z<sup>1</sup> et Z<sup>2</sup> font partie 25 d'un groupe hétérocyclique aromatique sont particulièrement intéressants. Comme exemple d'un tel substituant, on peut 30 citer les substituants dans lesquels chacun des segments  $-C-Z^1-C-$  et  $-C-Z^2-C-$  fait partie d'un groupe hétérocyclique choisi parmi les groupes pyridyle, pyrimidinyle, quinolyle et iso-quinolyle, les deux groupes hétérocycliques étant 35 reliés au moins par les deux atomes de carbone séparant Z<sup>1</sup> et Z<sup>2</sup>. Comme exemples de tels segments  $-C-Z^1-C-C-Z^2-C-$ , on peut citer les groupes 2,2'-bipyridinyle, 1,10-phénanthro-

linyle, 2,2'-bisquinolyle, 2,2'-bisisoquinolyle et 2,2'-bipyrimidinyle, lesdits groupes pouvant porter des substituants alkyle ou alkoxy sur au moins un atome de carbone d'un hétérocycle, de préférence un groupe alkyle ou 5 alcoxy ayant de 1 à 5 atomes de carbone. A titre d'exemples, les formules ci-dessous représentent respectivement un groupe 2,2'-bipyridyle portant un carboxyle, un monoalkylphosphonate, un monoarylphosphonate et un phosphonyle, ou un groupe phénanthrolinyle portant un groupe carboxyle.



10

Le substituant  $R^5$  est un substituant qui permet de former trois cycles chélates avec un lanthanide. Parmi les substituants  $R^5$  constitués par une chaîne hydrocarbonée -C-C-E<sup>1</sup>-C-C-E<sup>2</sup>-C-A<sup>5</sup>, on peut citer les groupements suivants :



15

dans lesquels R<sup>6</sup> et R<sup>7</sup> représentent des chaînes alkyles ayant de préférence de 1 à 5 atomes de carbone et contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes. Les composés dans lesquels R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> sont identiques sont particulièrement 5 préférés.

Telle qu'utilisée ici, l'expression "groupe qui est anionique à pH neutre" signifie un groupe fonctionnel qui, à pH neutre, se trouve sous forme anionique, c'est-à-dire porteur d'une charge négative. Dans un composé de 10 l'invention, les groupes anioniques à pH neutre A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup> ou A<sup>5</sup> peuvent être choisis indépendamment les uns des autres parmi les groupes -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -P(O)(OR)OH, -P(O)R(OH) et -P(O)(OH)<sub>2</sub> dans lesquels R est un groupe alkyle (de préférence en C<sub>1</sub> à C<sub>3</sub>) ou un groupe aryle (de préférence en 15 C<sub>5</sub> à C<sub>9</sub>). Suivant le pH du milieu réactionnel, les composés (I) sont obtenus sous forme cationique, zwitterionique ou anionique. En milieu acide, l'azote porteur des substituants R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup>, ainsi qu'éventuellement les hétéroatomes Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, E<sup>1</sup> et E<sup>2</sup> se trouvent sous forme protonée et le composé est sous 20 forme cationique. En milieu basique, les différents groupes A<sup>i</sup> se présentent sous forme de sels et le composé est sous forme anionique. À des pH intermédiaires, de l'ordre de 6 à 8, le composé se présente sous forme zwitterionique.

Un complexe selon la présente invention est constitué 25 par un ion lanthanide Ln complexé par un ligand qui répond à la formule (I) ci-dessus. L'ion lanthanide est choisi parmi les ions europium, terbium, samarium, dysprosium, erbium, ytterbium, néodyme et gadolinium. On utilisera de préférence leuropium, le terbium, le samarium ou le dysprosium si le 30 complexe est destiné à être utilisé pour le marquage par fluorescence, et leuropium, le dysprosium ou le gadolinium lorsque le complexe est destiné à être utilisé comme agent de contraste pour l'IRMN.

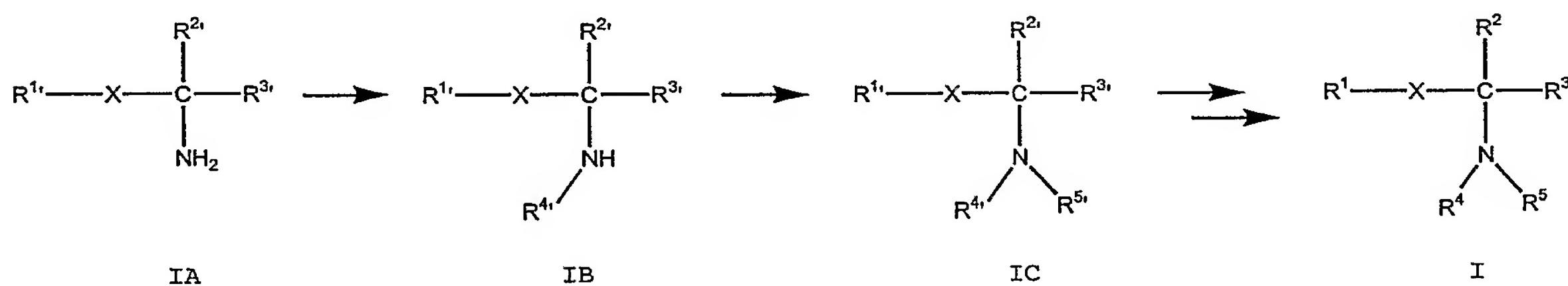
Dans un complexe selon l'invention dans lequel R<sup>4</sup> est 35 -C-C-Z<sup>1</sup>-C-C-Z<sup>2</sup>-C-A<sup>4</sup>, les 3 cycles chélates se forment entre le cation lanthanide et respectivement :

- l'atome N portant R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup>, Z<sup>1</sup> et les atomes de carbone qui les séparent ;
- Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup> et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- le segment terminal Z<sup>2</sup>-C-A<sup>4</sup>.

5 Lorsque R<sup>5</sup> est du même type que R<sup>4</sup>, il forme avec l'ion lanthanide des chélates du même type que ceux formés par R<sub>4</sub>. Lorsque R<sup>5</sup> est du type -C-C-E<sup>1</sup>-C-C-E<sup>2</sup>-C-A<sup>5</sup>, 3 cycles chélates à 5 membres se forment entre le cation lanthanide et respectivement :

- 10 - l'atome N portant R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup>, E<sup>1</sup> et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- E<sup>1</sup>, E<sup>2</sup> et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
  - le segment terminal E<sup>2</sup>-C-A<sup>5</sup>.

15 Un composé (I) peut être obtenu par des procédés bien connus de l'homme de métier à partir de produits commerciaux ou décrits dans la littérature par le schéma suivant :



dans lequel X, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> ont la signification donnée précédemment, et R<sup>1'</sup>, R<sup>2'</sup>, R<sup>3'</sup>, R<sup>4'</sup> et R<sup>5'</sup> représentent 20 des groupements précurseurs de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> respectivement.

Au cours des deux premières étapes, on introduit successivement les groupements R<sup>4'</sup> et R<sup>5'</sup> sur une molécule IA contenant X et les groupes R<sup>1'</sup>, R<sup>2'</sup> et R<sup>3'</sup> pour obtenir le 25 composés IC.

Au cours d'étapes ultérieures, on transforme les groupes R<sup>1'</sup>, R<sup>2'</sup>, R<sup>3'</sup>, R<sup>4'</sup> et R<sup>5'</sup> du composé IC respectivement en groupes R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup>.

Lorsque les groupements R<sup>4'</sup> et R<sup>5'</sup> sont identiques en 30 vue d'obtenir des groupements R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> identiques, ils sont introduits simultanément au cours de la première étape. Lorsqu'ils sont différents, ils sont introduits dans un

ordre indifférent par réaction de la molécule IA successivement avec deux réactifs différents.

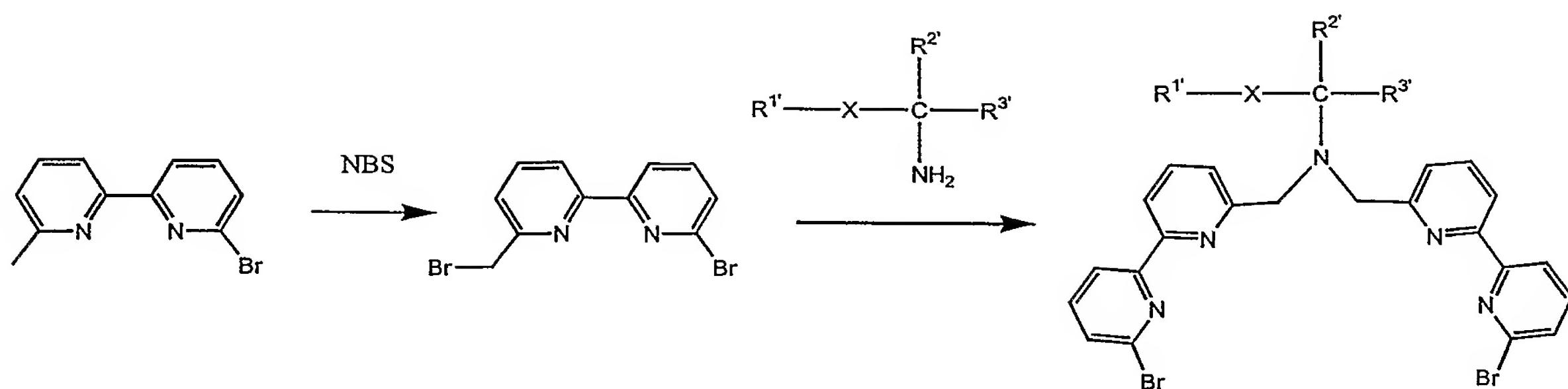
Lorsque le composé (I) est un composé dans lequel les groupements R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> sont des fonctions carboxyles, le 5 groupement R<sup>3</sup> est un atome d'hydrogène et le groupement X est une simple liaison, un groupe méthylène ou un groupe éthylène, on choisira avantageusement comme produit de départ IA respectivement le diester éthylique de l'acide aminomalonique, le diester méthylique de l'acide aspartique 10 et le diester méthylique de l'acide glutamique, qui sont des produits disponibles dans le commerce.

Lorsque le composé (I) est un composé dans lequel :

- les groupements R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> sont des fonctions carboxyles,
- le groupement R<sup>3</sup> est un atome d'hydrogène et
- 15 - le groupement X est un propylène ou un benzène parasubstitué,

on peut utiliser comme produit de départ IA respectivement le diester méthylique de l'acide 2-amino-adipique (dont la préparation est décrite par Lerch, E. et al, Helv. Chim. 20 Acta, 1974, 57, 1584) et l'ester méthylique de l'acide ( $\alpha$ -amino-4-methoxycarbonyl)benzène acétique (dont la préparation est décrite par Chauvel, E. et al, J. Med. Chem. 1994, 37, 1339).

Lorsque les groupements R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> sont identiques et 25 leurs segments -C-C-Z<sup>1</sup>-C-C-Z<sup>2</sup>-C- sont dérivés de la 2,2'-bipyridine, on fait réagir le produit de départ au cours de la première étape, avec la 6-bromométhyl-6'-bromo-2,2'-bipyridine pour obtenir un composé dibromé IC. La 6-bromométhyl-6'-bromo-2,2'-bipyridine peut être obtenue par 30 une réaction de bromation radicalaire de la 6-méthyl-6'-bromo-2,2'-bipyridine par la N-bromo-succinimide dans le benzène, la 6-méthyl-6'-bromo-2,2'-bipyridine étant obtenue selon la méthode décrite par Houghton M. et al, J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1997, 2725. Le schéma réactionnel de la 35 première étape de ce cas particulier est donné ci-après.



Lorsque le composé dibromé IC est soumis à une carboalkoxylation, suivie d'une saponification avec NaOH et d'une acidification avec HCl, on obtient un composé (I) dans lequel les groupements A<sup>4</sup> et A<sup>5</sup> sont des groupes carboxyles.

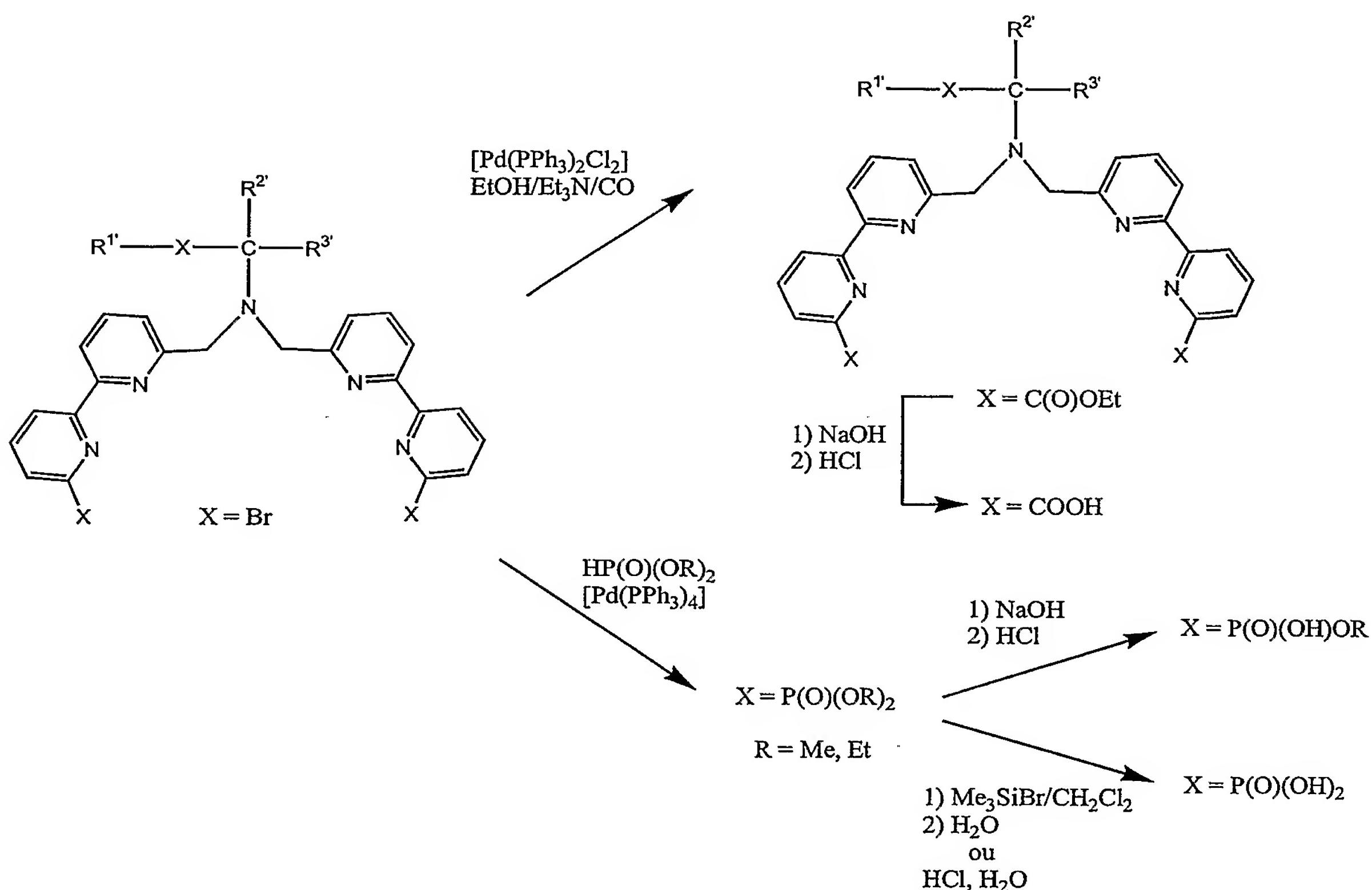
5 La carboalkoxylation peut être effectuée suivant le procédé décrit par El-Ghayoury et al, J. Org. Chem., 2000, 65, 7757.

Lorsqu'on fait réagir le composé dibromé IC avec le dialkylphosphite (selon la méthode décrite par Penicaud et al, Tetrahedron Lett. 1998, 39, 3689), on obtient le dialkylester de l'acide phosphonique, chaque atome de brome étant remplacé par un groupe P(O)(OR)<sub>2</sub>. Le dialkylester de l'acide phosphonique donne, par une saponification avec NaOH dans l'eau, suivie d'une acidification avec HCl, un composé 10 (I) dans lequel les groupements A<sup>4</sup> et A<sup>5</sup> sont des groupements P(O)(OH)OR.

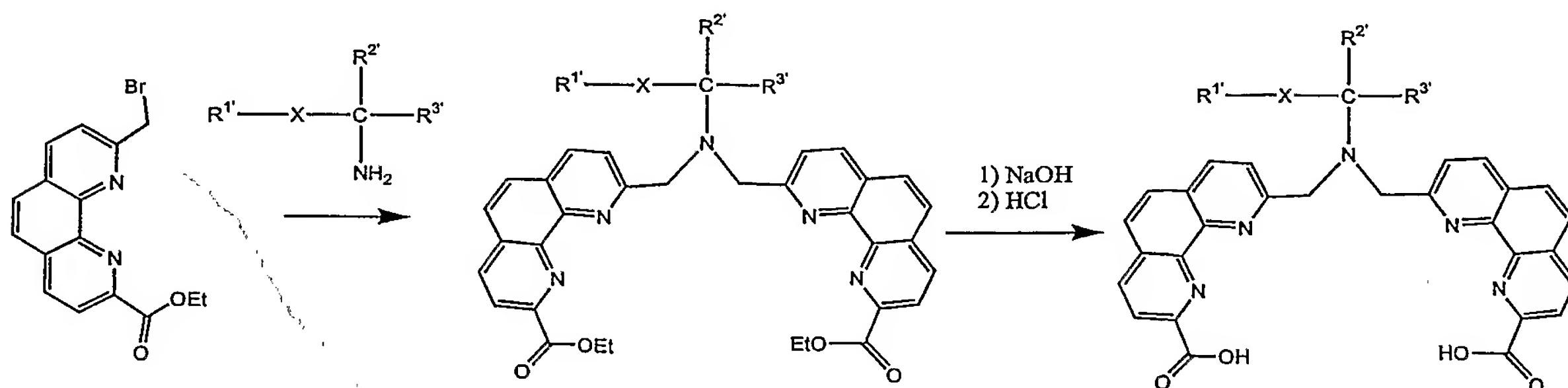
Par réaction du dialkylester de l'acide phosphonique P(O)(OR)<sub>2</sub> avec le bromure de triméthylsilyle suivie d'une hydrolyse (selon la méthode décrite par McKenna C. et al., Tetrahedron Lett, 1977, 18, 155), on obtient un composé (I) 20 dans lequel les deux groupes anioniques A<sup>4</sup> et A<sup>5</sup> sont des groupements P(O)(OH)<sub>2</sub>. Le même résultat peut être obtenu par une hydrolyse acide par HCl du dialkylester de l'acide phosphonique P(O)(OR)<sub>2</sub>.

25 Le schéma réactionnel des trois modes de mise en œuvre ci-dessus est donné ci-après.

10



Lorsque les groupements  $R^4$  et  $R^5$  sont identiques et leurs segments  $-C-C-Z^1-C-C-Z^2-C-$  sont dérivés de la 1,10-phénanthroline, on fait réagir le produit de départ au cours de la première étape avec la 2-bromométhyl-9-éthoxycarbonyl-1,10-phénanthroline. La préparation de la 2-bromométhyl-9-éthoxycarbonyl-1,10-phénanthroline est décrite par Ulrich G. et al, (Tetrahedron Lett. 2001, 42, 6113). En soumettant le composé diester obtenu, à une saponification avec NaOH, suivie d'une acidification avec HCl dilué, on obtient un composé (I) dans lequel les groupements  $A^4$  et  $A^5$  sont des carboxyles. Le schéma réactionnel est donné ci-après.



Un substituant R<sup>1</sup> souhaité peut être obtenu en choisissant soit un composé de départ qui le porte, soit un composé de départ qui porte un précurseur R<sup>1'</sup> du substituant souhaité. Lorsqu'un substituant R<sup>1</sup> est obtenu à partir d'un précurseur R<sup>1'</sup>, la formation du substituant souhaité peut se faire sur un composé de formule (IC) contenant le précurseur ou sur un complexe formé avec un cation lanthanide et un composé de formule (I) contenant le précurseur.

Un substituant R<sup>1</sup> du type carboxyle peut être obtenu par une réaction de saponification à partir d'un groupe précurseur R<sup>1'</sup> contenant une fonction ester carboxylique. Un substituant R<sup>1</sup> du type amino peut être obtenu à partir de la réduction d'un groupe précurseur R<sup>1'</sup> contenant une fonction nitro. Un substituant R<sup>1</sup> du type isothiocyanato peut être obtenu par réaction d'un précurseur R<sup>1'</sup> contenant une fonction amino avec le thiophosgène. Un substituant R<sup>1</sup> du type maléimido peut être obtenu par réaction d'un précurseur R<sup>1'</sup> contenant une fonction amino avec l'ester N- succinimidique de l'acide 4-maléimidobutyrique.

Un substituant R<sup>1</sup> du type ester N-succinimidique peut être obtenu à partir d'un complexe par activation d'un précurseur carboxyle avec de la N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide suivie d'une réaction avec la N-hydroxy-succinimide.

Un complexe selon l'invention peut être obtenu par réaction d'un composé donneur de cation lanthanide avec un composé de formule (I). Comme exemple de composés donneurs de cation lanthanide, on peut citer les halogénures de lanthanide hydratés, les nitrates de lanthanide hydratés, les carbonates de lanthanide et les triflates de lanthanide. La réaction est effectuée en solution dans un solvant. Le solvant est choisi de préférence parmi l'eau, le méthanol, l'éthanol ou l'acetonitrile.

Dans un mode de réalisation préféré, on fait réagir le composé (I) avec le précurseur de l'ion lanthanide dans un mélange de méthanol et d'eau à un pH allant de 3 à 5, pendant une durée comprise entre 10 minutes et 24 heures, à

une température comprise entre 25°C à 80°C. Ensuite, le pH de la solution est porté à 7,0 et le méthanol est évaporé avant d'isoler le complexe formé.

Les complexes de la présente invention peuvent être utilisés notamment pour le marquage par fluorescence ou pour l'imagerie par résonnance magnétique nucléaire. Pour ces applications, les groupes R<sup>1</sup> préférés sont les groupes amino, thio et carboxyle (qui doivent être activés avant le couplage covalent avec la molécule à marquer), et les groupes maléimido, ester N-succinimidique et isothiocyanato (qui peuvent se lier directement avec la molécule à marquer).

Les complexes de la présente invention sont utiles pour des analyses ou des dosages de composés par marquage des composés. Le procédé consiste à lier de manière covalente au composé à doser, un marqueur constitué par un complexe selon l'invention, et à détecter ou quantifier la présence du composé marqué grâce aux propriétés de luminescence du marqueur. Les complexes d'europium, de terbium, de samarium ou de dysprosium sont particulièrement préférés pour cette application.

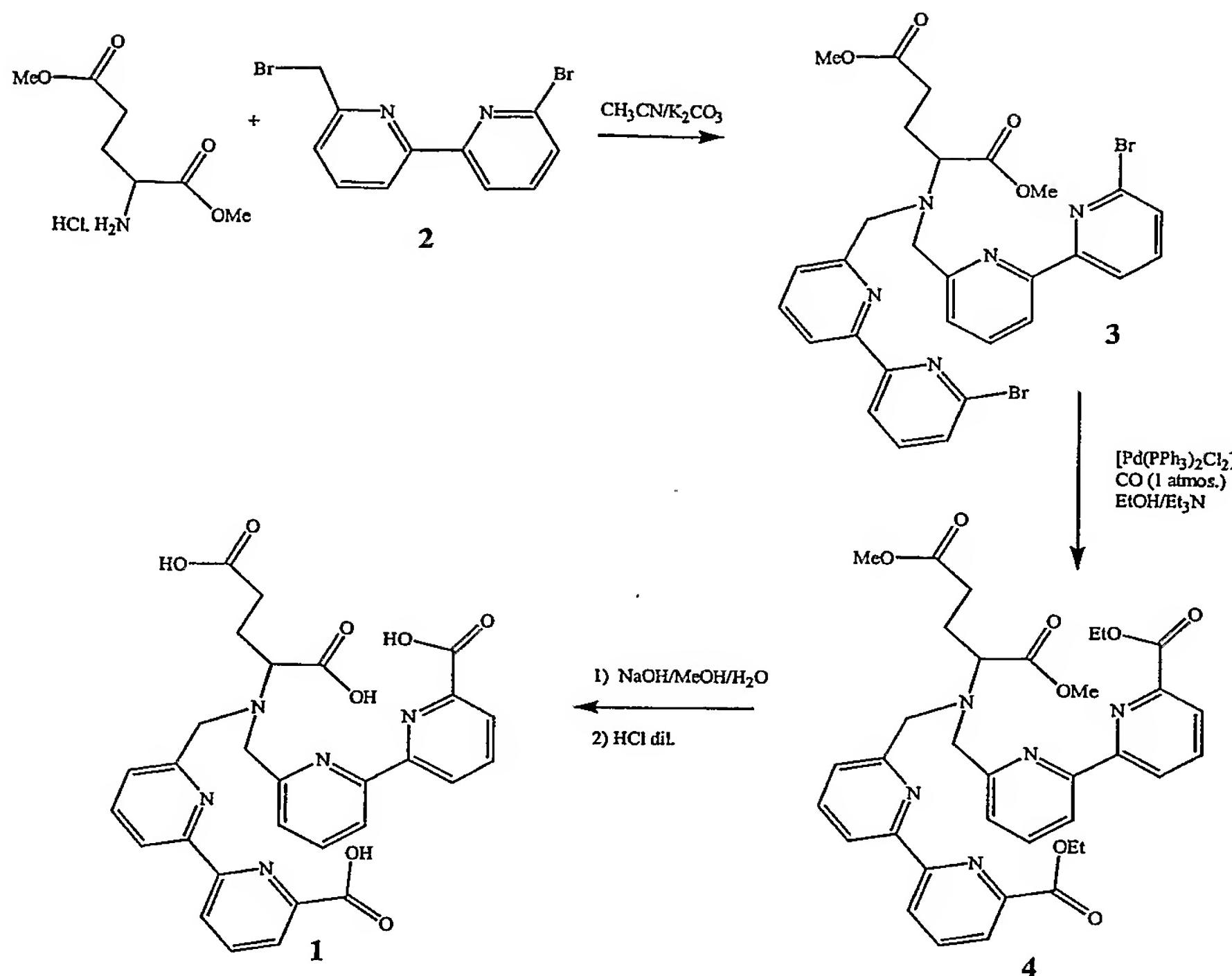
Lorsque les complexes d'ions lanthanides selon l'invention sont destinés à être utilisés comme agents de relaxation pour la résonnance magnétique nucléaire, on utilise de préférence des complexes de gadolinium, d'europium ou de dysprosium.

La présente invention sera décrite plus en détail par les exemples donnés ci-après à titre d'illustration, auxquels elle n'est cependant pas limitée.

#### Exemple 1

##### 30 Préparation du composé 1

Le composé 1 a été obtenu selon le schéma synthétique suivant. L'isomère (S) de l'ester glutamique choisi pourrait être remplacé par l'isomère (R) ou un mélange des deux isomères.



### Préparation du composé 2

Le composé 2 a été préparé selon le procédé décrit par S. Mameri, et al., dans *Synthesis*, 2003, 17, 2713. Dans un ballon de 250 mL, on introduit 1,5 g (6,0 mmol) de 6-méthyl-6'-bromo-2,2'-bipyridine, 66 mg (0,4 mmol) d'azo-bis-isobutyronitrile (AIBN), et 1,3 g (7,3 mmol) de N-bromosuccinimide dans 90 mL de benzène. La solution est chauffée à reflux pendant 2h30 en l'irradiant avec une lampe halogène standard de 100 W. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu solide est chromatographié sur silice en utilisant un gradiant de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexane de 50/50 à 100/0. On obtient 940 mg (2,9 mmol) de composé 2 (correspondant à un rendement de 48%) qui présente les caractéristiques suivantes :

*R*<sub>f</sub> = 0,42, SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) : δ 4,61 (s, 2H), 7,48 (d, 1H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 7,50 (d, 1H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 7,68 (t, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 7,83 (t, 1H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 8,33 (d, 1H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 8,44 (d, 1H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) : δ 34,0, 120,1, 120,7, 124,0, 128,2, 138,1, 139,3, 141,6, 154,3, 156,4, 156,9.

Analyses calculées pour C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> : C 40,28, H 2,46, N 8,54.

Trouvées : C 40,12, H 2,34, N 8,44.

5 FAB<sup>+</sup>/MS : 327 (50%), 329 (100%), 331 (50%, [2+H]<sup>+</sup>).

### Préparation du composé 3

Dans un tube de Schlenk sous atmosphère d'argon, on introduit 470 mg (2,22 mmol) de chlorhydrate du diméthyle ester de l'acide L-glutamique et 1,23 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8,90 mmol) dans 100 mL d'acétonitrile fraîchement distillée sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. La solution est chauffée à 80°C pendant 30 minutes. On ajoute 1,60 g (4,88 mmol) de composé 2 et on chauffe pendant 23 heures à 80°C. La solution est évaporée à sec, le résidu est redissous avec 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et 20 mL d'eau. La phase aqueuse est lavée avec deux portions de 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et la somme des phases organiques est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée à sec. Le résidu solide est soumis à une chromatographie flash sur silice (φ=5 cm, h=12 cm) avec un mélange de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (100/0 à 97/3) comme éluant. On obtient 20 995 mg (1,49 mmol) de composé 3 (correspondant à un rendement de 67%) qui présente les caractéristiques suivantes :

R<sub>f</sub> = 0,34, SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98/2).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) : δ 2,06-2,20 (m, 2H), 2,39-2,68 (m, 2H), 3,50 (s, 3H), 3,54-3,62 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,99-4,16 (m, 4H), 7,43-7,48 (m, 4H), 7,63 (t, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 7,71 (t, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 8,23 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 8,39 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) : δ 24,8, 30,3, 51,5, 57,2, 62,1, 119,6, 119,7, 123,5, 127,8, 137,3, 139,1, 141,5, 153,8, 157,4, 159,1, 173,1, 173,4.

Analyses calculées pour C<sub>29</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub> : C 52,04, H 4,07, N 10,46. Trouvées : C 51,81, H 3,85, N 10,19.

FAB<sup>+</sup>/MS : 670,2 ([3+H]<sup>+</sup>, 100%).

Préparation du composé 4

Dans un ballon bicol de 250 mL, on introduit 995 mg (1,49 mmol) de composé 3 et 150 mg (0,21 mmol) de [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] dans 50 mL d'éthanol et 50 mL de triéthylamine. La solution est chauffée à 70°C pendant 15 heures en faisant barboter un flux de CO. La solution est évaporée à sec, le solide obtenu est redissous dans 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtré sur célite, puis la phase organique est extraite avec 20 mL d'eau. La phase aqueuse est lavée avec deux portions de 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées puis évaporées à sec. Le résidu est soumis à une chromatographie flash sur silice ( $\phi=5$  cm, h=10 cm) avec un mélange de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99/1 à 90/10) comme éluant. On obtient 588 mg (0,90 mmol) de 4 sous forme d'une huile légèrement orangée (correspondant à un rendement de 60%), qui présente les caractéristiques suivantes :

$R_f = 0,30$ , SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95/5).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) :  $\delta$  1,46 (t, 6H, <sup>3</sup>J=7,0Hz), 2,06-2,19 (m, 2H), 2,38-2,65 (m, 2H), 3,49 (s, 3H), 3,55-3,63 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 4,02-4,19 (m, 4H), 4,48 (q, 4H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 7,47 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 7,75 (t, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 7,92 (t, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 8,10 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 8,40 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 8,62 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) :  $\delta$  14,3, 24,8, 30,4, 51,5, 57,2, 61,8, 62,0, 119,9, 123,5, 124,2, 124,8, 137,3, 137,7, 147,8, 154,6, 156,5, 159,0, 165,4, 173,2, 173,5.

Analyses calculées pour C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> : C 64,11, H 5,69, N 10,68.

Trouvées : C 64,07, H 5,55, N 10,53.

FAB<sup>+</sup>/MS : 656,2 ([4+H]<sup>+</sup>, 100%).

30 Préparation du composé 1

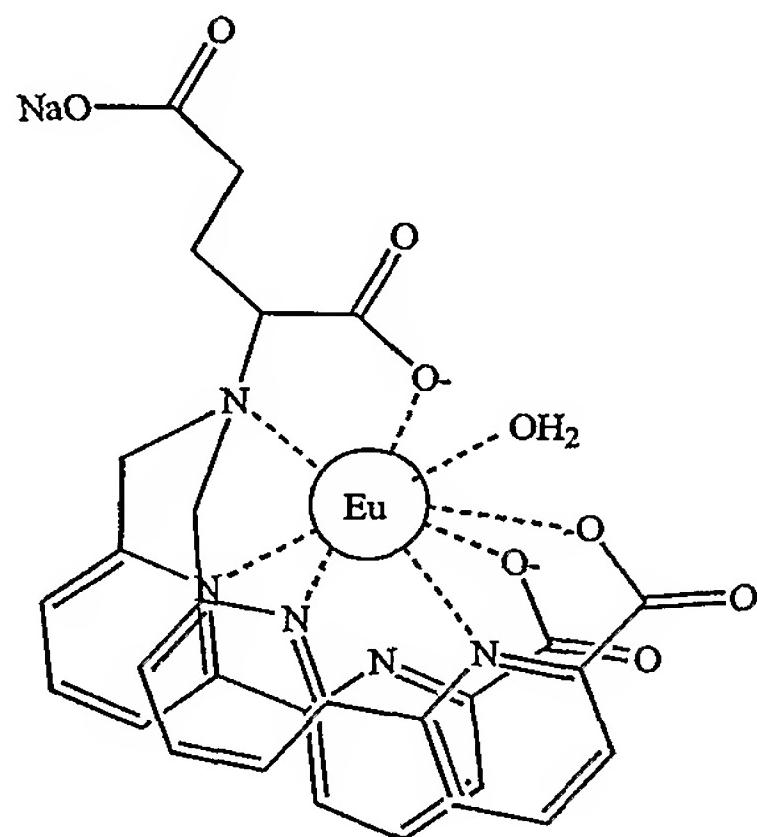
Dans un ballon équipé d'un réfrigérant, 588 mg (0,90 mmol) de 4 et 144 mg (3,60 mmol) de NaOH sont dissous dans un mélange de 50 mL de MeOH et 15 mL d'eau. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 5 heures. La solution est évaporée à sec et le solide est dissous dans 10 mL d'eau sur lesquels on ajoute lentement une solution d'HCl 2N jusqu'à pH = 2-3. Le précipité qui se forme est isolé par centrifugation et

séché sous vide. On obtient 411 mg (0,60 mmol) de composé 1 sous forme d'hydrochlorure 1.3HCl jaune pâle (correspondant à un rendement de 67%) dont les caractéristiques sont les suivantes :

- 5  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) :  $\delta$  2,26-2,48 (m, 2H), 2,80-2,84 (m, 2H), 3,95-3,99 (m, 1H), 4,53-4,81 (m, 4H), 7,47 (d, 2H,  $^3\text{J}=7,5$  Hz), 7,63 (t, 2H,  $^3\text{J}=8,0$  Hz), 7,90 (t, 2H,  $^3\text{J}=8,0$  Hz), 8,02 (d, 2H,  $^3\text{J}=7,5$  Hz), 8,42 (d, 2H,  $^3\text{J}=7,5$  Hz), 8,58 (d, 2H,  $^3\text{J}=7,5$  Hz).
- 10  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) :  $\delta$  23,1, 32,1, 57,0, 67,0, 122,3, 125,1, 125,9, 126,1, 139,7, 140,1, 149,0, 154,1, 155,5, 156,1, 168,0, 173,7, 176,4.
- Analyses calculées pour  $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_8 \cdot 3\text{HCl}$ : C 51,15, H 4,14, N 10,28. Trouvées : C 51,01, H 4,43, N 9,95.
- 15 FAB $^+$ /MS : 572,5 ([1+H] $^+$ , 100%).

### Exemple 2

#### Préparation du complexe 5 de formule [Eu.(1-4H). $\text{H}_2\text{O}$ ]Na



60 mg de 1.3HCl (88  $\mu\text{mol}$ ) sont dissous dans un mélange  
20 de 30 mL de MeOH et de 30 mL d'eau. A cette solution est ajouté un mélange de 36 mg (98  $\mu\text{mol}$ ) de  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dissous dans 3 mL de MeOH et 3 mL d'eau. La solution est chauffée à 70°C pendant 1 heure. Après refroidissement, le pH de la solution est remonté à 7,4 avec une solution à 5% de NaOH dans l'eau. La solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à apparition d'un léger trouble. Puis on ajoute du THF jusqu'à la formation d'un important précipité. Le

précipité est isolé par centrifugation, puis séché sous vide pour donner 62 mg (74 µmol) de composé 5 (correspondant à un rendement de 85%) sous forme de solide beige dont les caractéristiques sont les suivantes :

5  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}/t\text{-BuOH}$ , 200 MHz, tous les signaux se présentent sous forme de singulets larges) :  $\delta$  -9,40 (1H), -8,95 (1H), -4,23 (2H), -3,17 (1H), -2,21 (1H), 1,88 (1H), 2,73 (1H), 4,17 (1H), 6,06 (1H), 7,12 (1H), 7,80 (1H), 7,88 (1H), 8,90 (1H), 9,60 (1H), 9,89 (1H), 11,08 (1H), 11,38 (1H), 12,01 (1H).

Analyses calculées pour  $\text{C}_{29}\text{H}_{21}\text{NaN}_5\text{O}_8\text{Eu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  : C 41,84, H 3,75, N 8,41. Trouvées : C 41,93, H 3,62, N 8,44.

FAB $^+/\text{MS}$  : 720,2 (80%), 722,2 (100%),  $[\text{5}-\text{H}_2\text{O}-\text{Na}+2\text{H}]^+$ .

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3420, 1619, 1574, 1460, 1384, 1274.

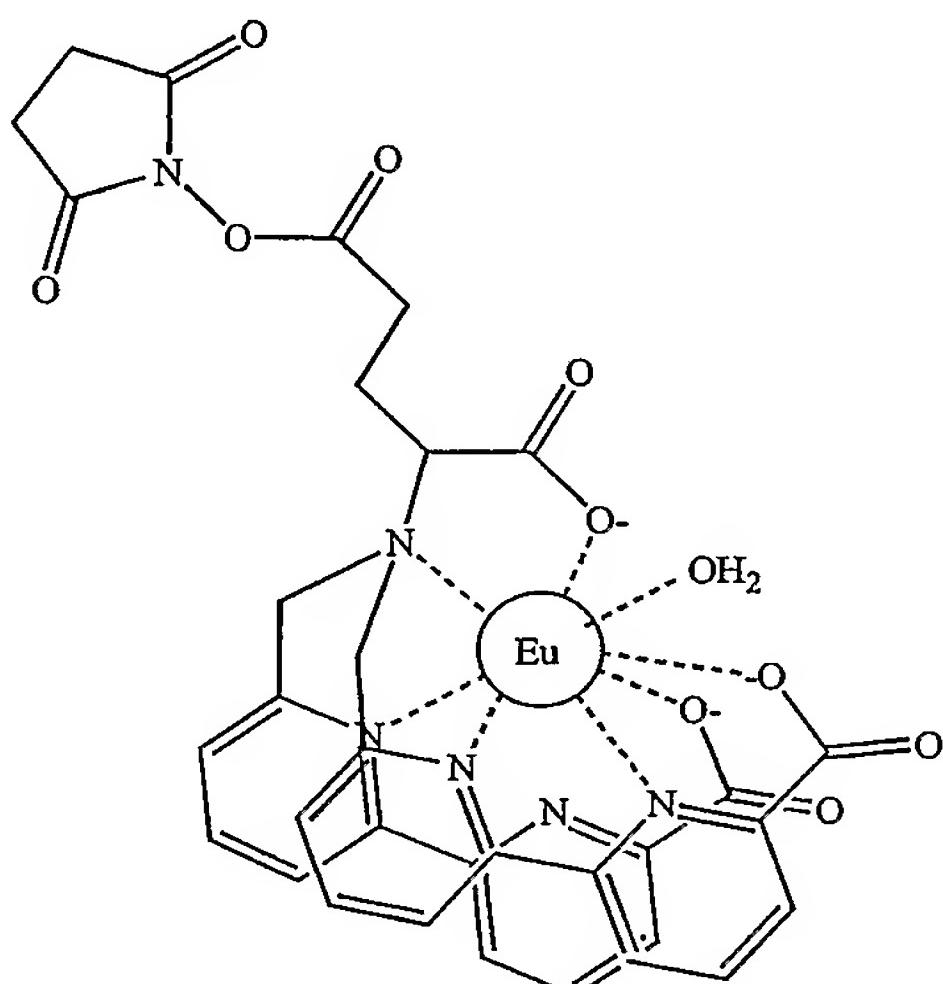
15 Propriétés photo-physiques dans l'eau:

Absorption,  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] ( $\varepsilon_{\text{max}}$  [ $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]) : 320 (épaulement), 308 (19700), 276 (8700), 267 (9700), 253 (14400).

Emission : caractéristique des composés de l'europtium avec des bandes fines à 581, 594, 615, 650 et 701 nm. Temps de vie de l'état excité : 0,62 ms. Rendement quantique (référence  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  dans l'eau) : 8%. Temps de vie de l'état excité dans l'eau lourde : 2,48 ms. Rendement quantique dans l'eau lourde : 35%.

### Exemple 3

25 Préparation du complexe 6 de formule :



40 mg (48 µmol) de complexe 5 et 12 mg (63 µmol) de sels d'hydrochlorure d'éthyle-N,N-diméthyle-3-aminopropyle-carbodiimide (EDCI.HCl) sont mis en suspension dans 6 mL de DMSO. A cette solution, on ajoute 7,0 mg (61 µmol) de N-5 hydroxysuccinimide. La solution est agitée à température ambiante pendant 66 heures, durant lesquelles le complexe 5 se dissout, puis un précipité blanc se forme. Le solide est isolé par centrifugation et séché sous vide à 50°C pendant 2 heures. On obtient 31 mg (34 µmol) de 6 (correspondant à un rendement de 71%) dont les caractéristiques sont les suivantes :

Analyses calculées pour  $C_{33}H_{25}EuN_6O_{10} \cdot 5H_2O$  : C 43,67, H 3,89, N 9,26. Trouvées : C 43,60, H 3,80, N 9,16.  
FAB<sup>+</sup>/MS : 720,1, 722,1 ( $[6-H_2O-C_4H_4NO_2+2H]^+$ , 100%), 817,1, 15 819,1 ( $[6-H_2O+H]^+$ , 30%).

IR (pastille de KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3420, 1739, 1629, 1573, 1459, 1384.

*Propriétés photo-physiques dans l'eau:*

Absorption,  $\lambda_{\max}$  [nm] ( $\epsilon_{\max}$  [ $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]) : 320 (épaulement), 309 20 (20000), 276 (10000), 267 (10500), 253 (16000).

Emission : caractéristique des composés de l'europtium avec des bandes fines à 581, 593, 615, 649 et 701 nm. Temps de vie de l'état excité : 0,63 ms. Rendement quantique (référence  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  dans l'eau) : 8%. Temps de vie de 25 l'état excité dans l'eau lourde : 2,47 ms. Rendement quantique dans l'eau lourde : 34%.

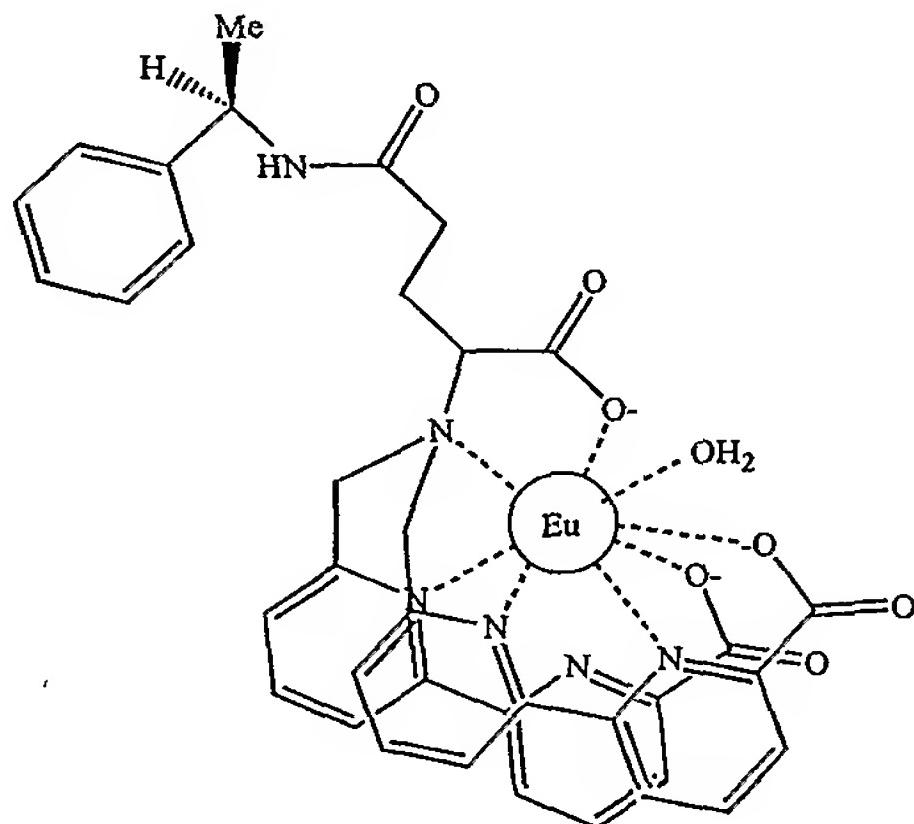
**Exemple 4**

**Marquage d'une amine par le complexe 5**

10 mg de complexe 5 (13,1 µmol) sont mis en suspension 30 dans 5 mL d'eau. On ajoute 3,5 mg (18,3 µmol) d'EDCI.HCl, puis 1,7 µL (13,2 µmol) de (+)-α-méthylbenzylamine. Après 15 minutes, puis une heure, on ajoute chaque fois 1,7 µL de (+)-α-méthylebenzylamine à température ambiante. L'agitation est poursuivie pendant 15 heures. La phase aqueuse est lavée 35 avec 2 fois 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , puis évaporée à sec, et l'on obtient 14 mg de solide jaune pâle. Après recristallisation

avec un mélange MeOH/Et<sub>2</sub>O, centrifugation et séchage sous vide, le complexe 7 (8,0 mg, 9,5 µmol) est récupéré sous forme de poudre crème (73%).

ISI-TOF/MS : 847,0513 ([7-H<sub>2</sub>O+Na]<sup>+</sup>, 60 %), 825,0912 ([7-<sub>5</sub>H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 28%). La formule du complexe 7 est représentée ci-dessous.



#### Exemple 5

##### Marquage de l'albumine sérique de bœuf ASB par le complexe 6

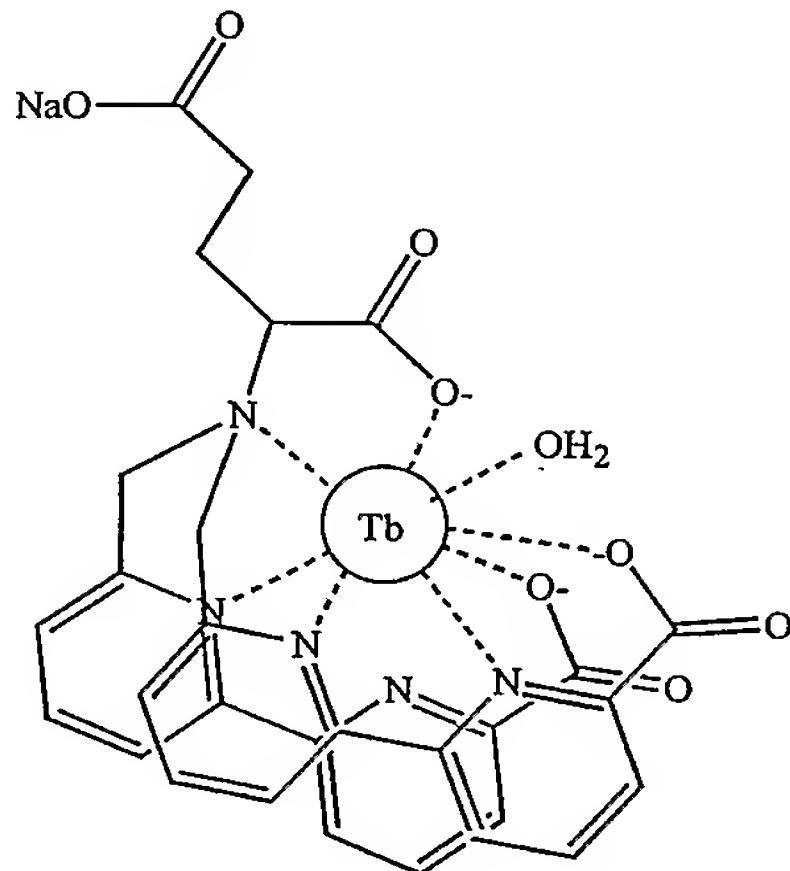
Le complexe 6 (2,0 mg) est ajouté à une solution d'ASB (5,4 mg) dans 1 mL de tampon borate (50 mM dans l'eau, pH = 7,0) afin d'obtenir un rapport molaire 6/ASB de 30:1. La solution est agitée à température ambiante, conduisant à une dissolution complète de 6 après 2 heures. Après 24 heures d'agitation, la solution est déposée sur un filtre centrifuge (Centricon, Millipore, filtre à 30 KDa) et le volume de la solution est réduit à 200-300 µL par filtration. La solution est diluée avec 3 mL d'eau, puis le volume est réduit de nouveau à 200-300 µL par filtration. Cette dernière opération est répétée 3 à 4 fois, jusqu'à ce que les eaux de filtration ne soient plus luminescentes sous irradiation UV (absence d'europtium). Les 200-300 µL de solution résiduelle contenant la protéine marquée et restant sur le filtre sont récupérés et stockés au frigidaire à 4°C.

Caractérisation de l'ASB marquée

Le spectre d'absorption UV-VIS de la solution aqueuse d'ASB marquée montre une absorption intense due aux complexes d'europtium, qui recouvre en partie l'absorption due à la protéine ( $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{\text{max}} = 38000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Par excitation de la solution dans la bande d'absorption des bipyridines (308 nm), on observe un spectre d'émission typique des composés d'europtium, avec un temps de vie de l'état excité moyen de 1,1 ms (la décroissance n'est pas purement mono-exponentielle) et un rendement quantique de luminescence de 13%.

La caractérisation par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF (Matrice Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Fly = Ionisation par désorption sur matrice assistée par Laser, analyse par temps de vol) s'effectue de la manière suivante. Une solution aqueuse d'ASB marquée est traitée à l'acide trifluoroacétique à 1% pour décomplexer l'europtium, puis la protéine est adsorbée sur une colonne de chromatographie dont la phase solide hydrophobe est constituée de chaîne en C<sub>4</sub>. Après lavage à l'eau, la protéine est relarguée avec de l'acétonitrile, puis analysée par MALDI-TOF (matrice d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique). La masse moyenne obtenue pour la protéine marquée sans europtium est de 71700 Da (ASB, M = 66610 Da), conduisant à un rapport molaire marqueurs/BSA de 9/1 dans la protéine marquée.

## Exemple 6

Préparation du complexe 8 de formule [Tb.(1-4H).H<sub>2</sub>O]Na

Dans un ballon de 250 mL équipé d'un réfrigérant, 40 mg  
 5 (59 µmol) de composé 1.3HCl sont dissous dans un mélange de  
 30 mL de MeOH et de 30 mL d'eau. A cette solution sont  
 ajoutés 25 mg (67 µmol) de TbCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O dissous dans 5 mL de  
 MeOH et 5 mL d'eau. La solution est chauffée à 70°C pendant  
 une heure. Après refroidissement, le pH de la solution est  
 10 porté à 7,2 avec une solution à 1% de NaOH dans l'eau. La  
 solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à  
 apparition d'un léger trouble, puis on ajoute du THF jusqu'à  
 la formation d'un important précipité. Un solide jaune pâle  
 est isolé par centrifugation, puis séché sous vide. On  
 15 obtient 46 mg (56 µmol) de complexe 8 (correspondant à un  
 rendement de 95%) dont les caractéristiques sont les  
 suivantes :

Analyses calculées pour C<sub>29</sub>H<sub>21</sub>NaN<sub>5</sub>O<sub>8</sub>Tb.4H<sub>2</sub>O : C 42,40, H 3,56,  
 N 8,53. Trouvées : C 42,28, H 3,31, N 8,38.  
 20 FAB<sup>-</sup>/MS : 668,2 ([8-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>COONa]<sup>-</sup>, 100%), 726,2 ([8-H<sub>2</sub>O-Na]<sup>-</sup>,  
 30%).

IR (pastille de KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3428, 1592, 1574, 1466, 1416,  
 1387.

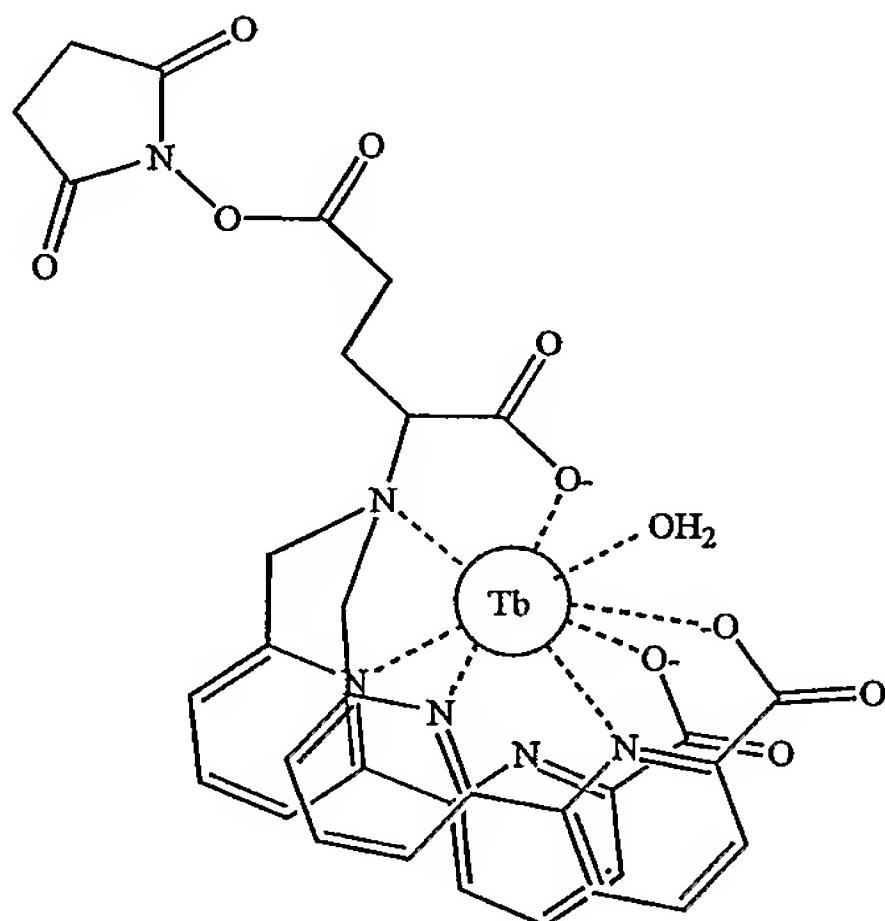
*Propriétés photo-physiques dans l'eau:*

Absorption,  $\lambda_{\max}$  [nm] ( $\varepsilon_{\max}$  [M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>]) : 320 (épaulement), 308  
 25 (20800), 277 (8900), 267 (10400), 253 (15000).

Emission : caractéristique des composés du terbium avec des bandes fines à 487, 543, 583 et 621 nm. Temps de vie de l'état excité : 1,48 ms. Rendement quantique (référence sulphate de quinine dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N) : 31%. Temps de vie de l'état excité dans l'eau lourde : 2,53 ms. Rendement quantique dans l'eau lourde : 53%.

### Exemple 7

#### Préparation du complexe 9 de formule



Dans un ballon de 10 mL, 50 mg (61 µmol) de complexe 8 sont mis en suspension dans 5 mL de DMSO. A cette solution on ajoute 9 mg (78 µmol) de N-hydroxysuccinimide et 13 mg (68 µmol) de sels d'hydrochlorure d'éthyle-N,N-diméthyle-3-aminopropyle-carbodiimide (EDCI.HCl). La solution est agitée à température ambiante pendant 138 heures durant lesquelles le complexe 8 se dissout, puis un précipité blanc se forme. Le solide est isolé par centrifugation, lavé au THF et séché sous vide. L'addition de THF aux eaux-mères provoque la formation d'un précipité supplémentaire, que l'on récupère par centrifugation. On obtient en tout 49 mg (55 µmol) de complexe 9 (correspondant à un rendement de 90%) dont les caractéristiques sont les suivantes :

Analyses calculées pour C<sub>33</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>Tb.4H<sub>2</sub>O : C 44,21, H 3,71, N 9,29. Trouvées : C 44,01, H 3,42, N 9,29.  
FAB<sup>+</sup>/MS : 726,2 ([9-H<sub>2</sub>O-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 15%), 825,5 ([9-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 100%).

IR (pastille de KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3433, 1741, 1624, 1594, 1574, 1464, 1419, 1375.

Propriétés photo-physiques dans l'eau

Absorption,  $\lambda_{\max}$  [nm] ( $\varepsilon_{\max}$  [ $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]) : 308 (18700), 276, 267, 5 253.

Emission : caractéristique des composés du terbium avec des bandes fines à 487, 543, 583 et 621 nm. Temps de vie de l'état excité : 1,50 ms. Rendement quantique (référence sulphate de quinine dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N) : 34%. Temps de vie de 10 l'état excité dans l'eau lourde : 2,42 ms. Rendement quantique dans l'eau lourde : 62%.

**Exemple 8**

**Marquage de l'albumine sérique de bœuf ASB par le complexe 9 et mise en évidence par microscopie de luminescence en temps résolu.**

Le marquage de l'albumine sérique de bœuf a été effectué selon la méthode décrite dans l'exemple 5 en remplaçant le complexe 6 par le complexe 9.

Détermination du rapport molaire marqueurs/BSA

20 Le rapport molaire marqueurs/BSA (nombre de complexes 9 liés de façon covalente à l'ASB) est déterminé par absorption différentielle à 308 nm. Les coefficients d'absorption molaire de l'ASB native et de l'ASB marquée sont mesurés à 308 nm. La différence de ces deux valeurs est divisée par le 25 coefficient d'absorption molaire du complexe 9 à 308 nm, pour donner un rapport molaire marqueurs/BSA de 6/1 dans la protéine marquée.

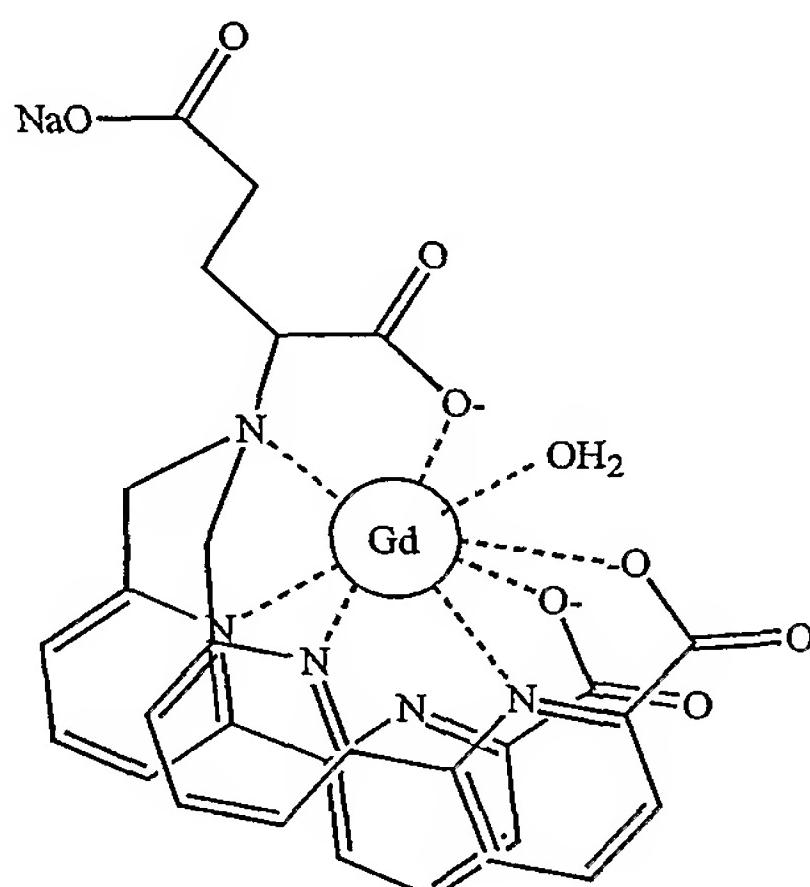
La figure 1 représente des gouttelettes d'environ 750 microns de diamètre contenant l'ASB marquée par le composé 9 30 (colonnes de gauche et de droite sur chaque image) et un anticorps marqué par de la fluorescéine (colonne du milieu sur chaque image) servant de référence (Immunoglobuline de lapin marquée à la fluorescéine produit par Dako-Immunoglobuline sous le code produit F-123). L'image obtenue 35 par microscopie de fluorescence conventionnelle (gauche) met en évidence la fluorescence des deux composés. L'image

obtenue par microscopie de luminescence en temps résolu (délai = 0,5 ms, temps d'intégration = 5,0 ms) montre la disparition de la fluorescence du composé de référence alors que la luminescence de l'ASB marquée perdure.

5

### Exemple 9

#### Préparation du complexe 10 de formule [Gd.(1-4H).H<sub>2</sub>O] Na



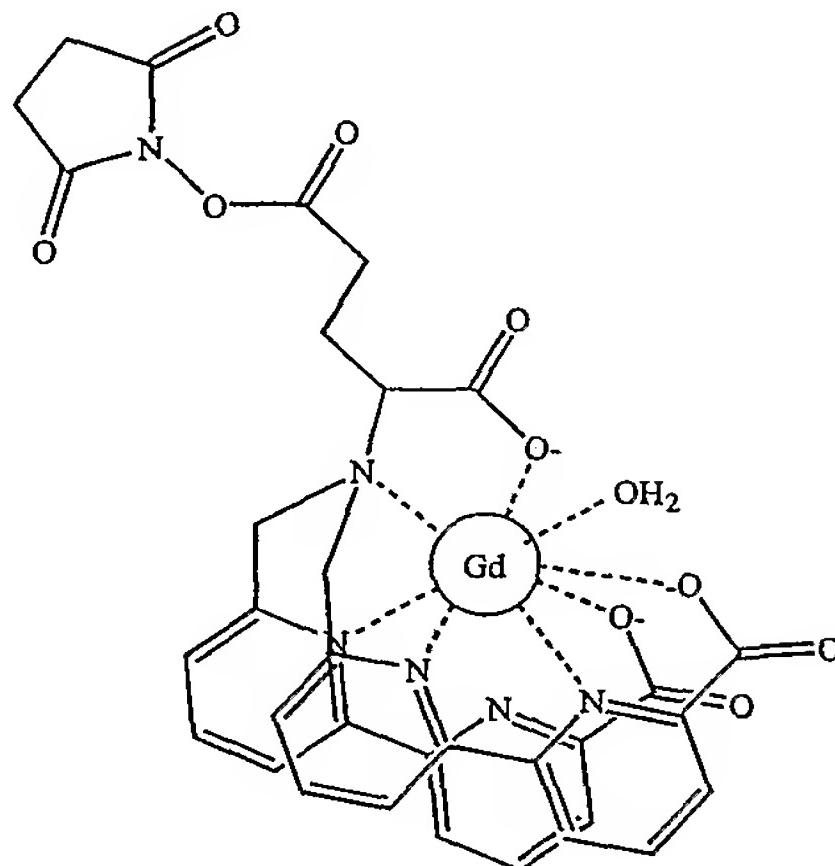
Dans un ballon de 100 mL équipé d'un réfrigérant, 30 mg (44 µmol) de composé 1.3HCl sont dissous dans un mélange de 10 25 mL de MeOH et de 25 mL d'eau. A cette solution on ajoute 19 mg (51 µmol) de GdCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O dissous dans 5 mL de MeOH et 5 mL d'eau. La solution est chauffée à 70°C pendant une heure. Après refroidissement le pH de la solution est remonté à 7,5 avec une solution à 0,5% de NaOH dans l'eau. La solution est 15 concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à apparition d'un léger trouble puis on ajoute du THF jusqu'à la formation d'un important précipité. Le solide jaune pâle est isolé par centrifugation puis séché sous vide pour donner 30 mg (37 µmol) de complexe 10 (correspondant à un rendement de 85%) 20 dont les caractéristiques sont les suivantes :

Analyses calculées pour C<sub>29</sub>H<sub>21</sub>GdNaN<sub>5</sub>O<sub>8</sub>.3H<sub>2</sub>O : C 43,44, H 3,39, N 8,73. Trouvées : C 43,35, H 3,17, N 8,55.

FAB<sup>-</sup>/MS : 667,2 ([10-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>COONa]<sup>-</sup>, 100%), 725,2 ([10-H<sub>2</sub>O-Na]<sup>-</sup>, 45%).

25 IR (pastille de KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3422, 1637, 1592, 1459, 1419, 1385.

**Exemple 10**  
**Préparation du complexe 11 de formule**



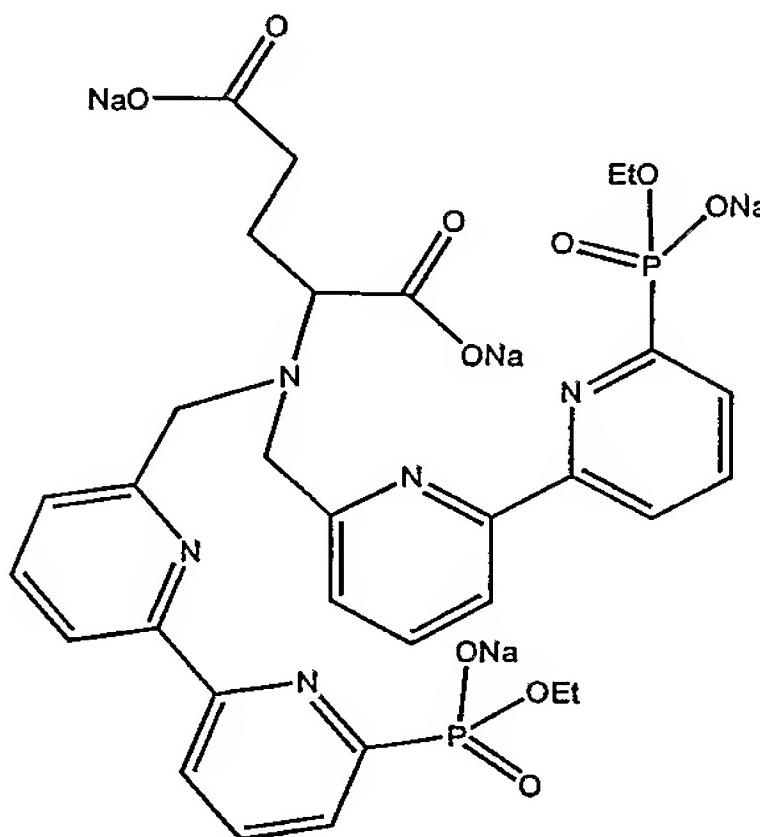
Dans un ballon de 10 mL, 50 mg (62 µmol) de composé 10  
 5 sont mis en suspension dans 5 mL de DMSO. A cette solution on ajoute 9 mg (78 µmol) de N-hydroxysuccinimide et 15 mg (78 µmol) de sels d'hydrochlorure d'éthyle-N,N-diméthyle-3-aminopropyle-carbodiimide (EDCI.HCl). La solution est agitée à température ambiante pendant 48 heures durant lesquelles  
 10 le complexe 10 se dissout, puis un précipité blanc se forme. Le solide est isolé par centrifugation, lavé au THF et séché sous vide. L'addition de THF aux eaux-mères provoque la formation de précipité supplémentaire, que l'on récupère par centrifugation. En tout, on obtient 45 mg (51 µmol) de  
 15 complexe 11 (correspondant à un rendement de 82%) dont les caractéristiques sont les suivantes :

Analyses calculées pour  $C_{33}H_{25}GdN_6O_{10} \cdot 3H_2O$  : C 45,20, H 3,56, N 9,37. Trouvées : C 45,02, H 3,18, N 9,21.

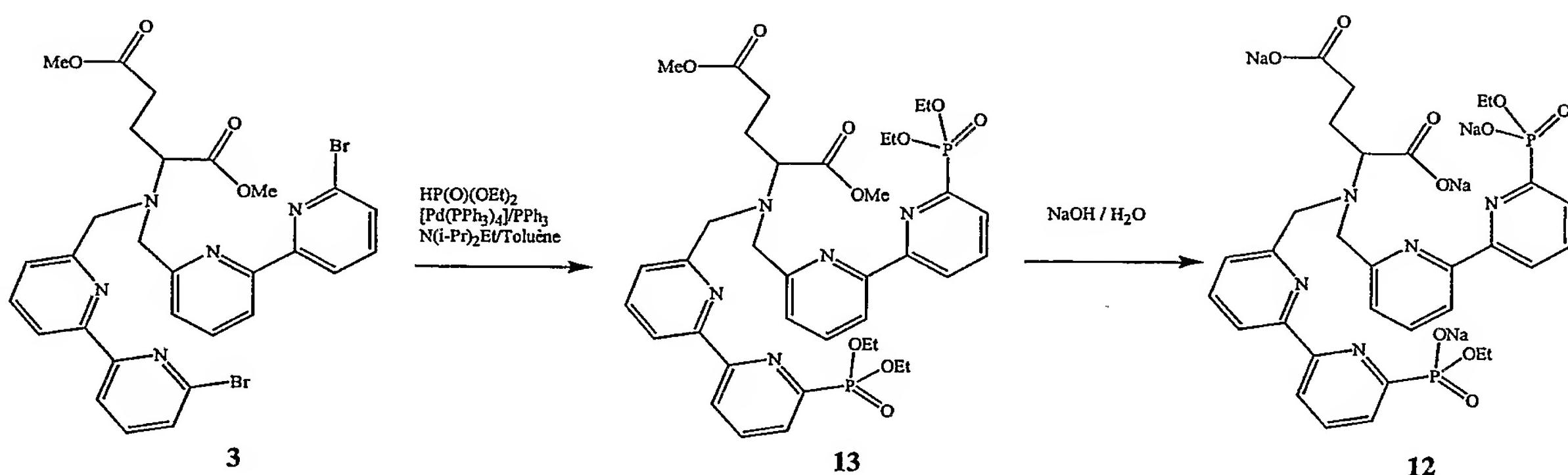
FAB<sup>+</sup>/MS : 726,5 ([11-H<sub>2</sub>O-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>+2H]<sup>+</sup>, 20%), 824,2 ([11-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 100%).

IR (pastille de KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3435, 1741, 1623, 1573, 1465, 1420, 1376.

**Exemple 11**  
**Préparation du composé 12**



Ce composé est obtenu en deux étapes à partir du  
 5 composé 3 selon le schéma synthétique suivant :



Préparation du composé 13

Dans un tube de Schlenk sous atmosphère d'argon, on introduit 200 mg (0,30 mmol) de composé 3, 90 µL (0,70 mmol) 10 de diéthylphosphite, 78 mg (0,30 mmol) de  $\text{PPh}_3$  et 300 µL de diisopropyléthylamine fraîchement distillée dans 10 mL de toluène. La solution est dégazée à l'argon pendant 20 minutes. On ajoute 34 mg (0,03 mmol) de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  et la 15 solution est chauffée à 100°C pendant 16 heures. On ajoute 40 µL (0,31 mmol) de diéthylphosphite et 34 mg (0,03 mmol) de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  et la solution est à nouveau chauffée à 100°C pendant 16 heures. La solution est évaporée à sec. Le résidu solide est purifié par chromatographie flash sur silice ( $\phi=3$  cm,  $h=15$  cm) avec un mélange de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (99/1 à

95/5) comme éluant. Les fractions pures sont évaporées, solubilisées dans 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et lavées avec 10 mL d'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. On obtient 72 mg (0,09 mmol) de composé 13 (correspondant à un rendement de 31%) sous forme d'une huile qui présente les caractéristiques suivantes :

*R*<sub>f</sub> = 0,56, SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (90/10).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) : δ 1,35 (t, 12H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 2,02-2,22 (m, 2H), 2,37-2,71 (m, 2H), 3,47 (s, 3H), 3,54-3,61 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 4,01-4,17 (m, 4H), 4,18-4,36 (m, 8H), 7,47 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 7,73 (t, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 7,81-7,97 (m, 4H), 8,32 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 8,59 (dt, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>=7,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-P</sub>=<sup>4</sup>J<sub>H-H</sub>=2,0 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) : δ 16,3, 16,4, 24,7, 30,3, 51,4, 57,1, 61,9, 63,0, 63,1, 119,6, 123,2 (2), 123,4, 127,4, 127,9, 136,7, 137,0, 137,2, 149,0, 153,5, 154,5, 156,5, 156,9, 159,0, 173,1, 173,4.

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz) : δ 11,73.

#### Préparation du composé 12

Dans un ballon de 50 mL équipé d'un réfrigérant, 51 mg (65 µmol) de composé 13 sont dissous dans 6 mL de solution de NaOH 0,05 N dans l'eau. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 19 heures. Après refroidissement la phase aqueuse est extraite avec 4 portions de 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puis évaporée à sec. Le produit précipite dans un mélange H<sub>2</sub>O/THF. On obtient 45 mg (51 µmol) de composé 12 (correspondant à un rendement de 79%) sous forme de poudre de couleur crème dont les caractéristiques sont les suivantes :

<sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O/<sup>t</sup>BuOH, 300 MHz) : δ 1,18 (t, 6H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 2,06-2,27 (m, 2H), 2,37-2,58 (m, 2H), 3,50 (t, 3H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 3,86-3,99 (m, 4H), 4,02-4,24 (m, 4H), 7,48 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 7,59-7,81 (m, 10H).

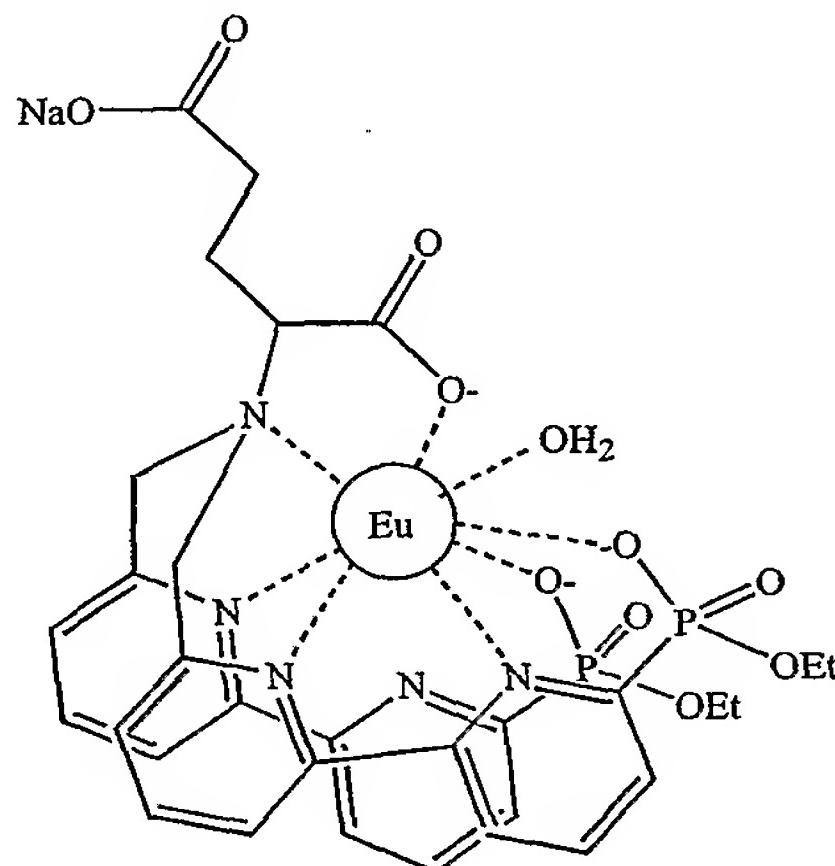
<sup>13</sup>C-RMN (D<sub>2</sub>O/<sup>t</sup>BuOH, 75 MHz) : δ 16,4, 16,5, 27,8, 35,6, 59,8, 62,4, 62,5, 71,6, 121,2, 124,0, 124,1, 125,7, 127,1, 127,4, 138,0, 138,2, 138,5, 154,6, 155,0, 156,3, 156,6, 157,8, 160,6, 181,1, 183,6.

<sup>31</sup>P-RMN (D<sub>2</sub>O, 162 MHz) : δ 10,17

Analyses calculées pour  $C_{31}H_{31}N_5Na_4O_{10}P_2 \cdot 5H_2O$  : C 42,43, H 4,71, N 7,98. Trouvées : C 42,35, H 4,55, N 7,78.  
 FAB<sup>+</sup>/MS : 764,2 ( $[12-Na]^+$ , 10%).

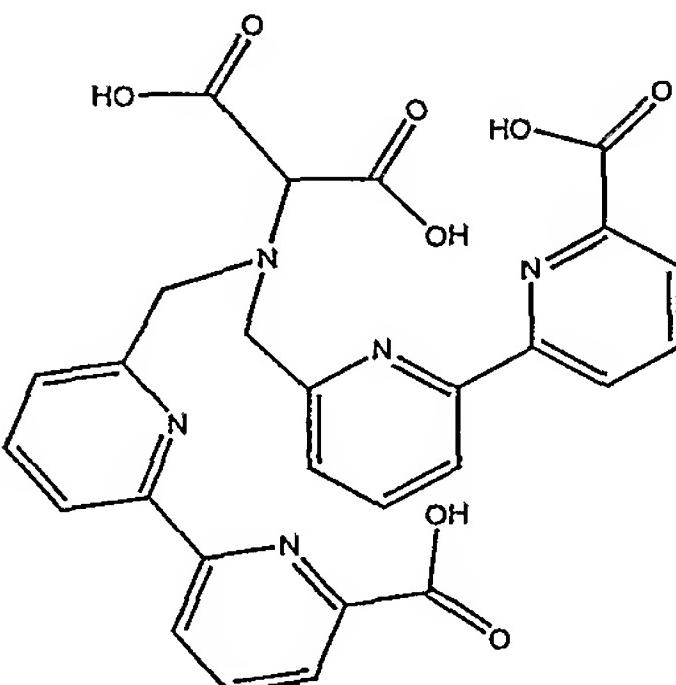
### Exemple 12

#### 5 Préparation du complexe 14 de formule

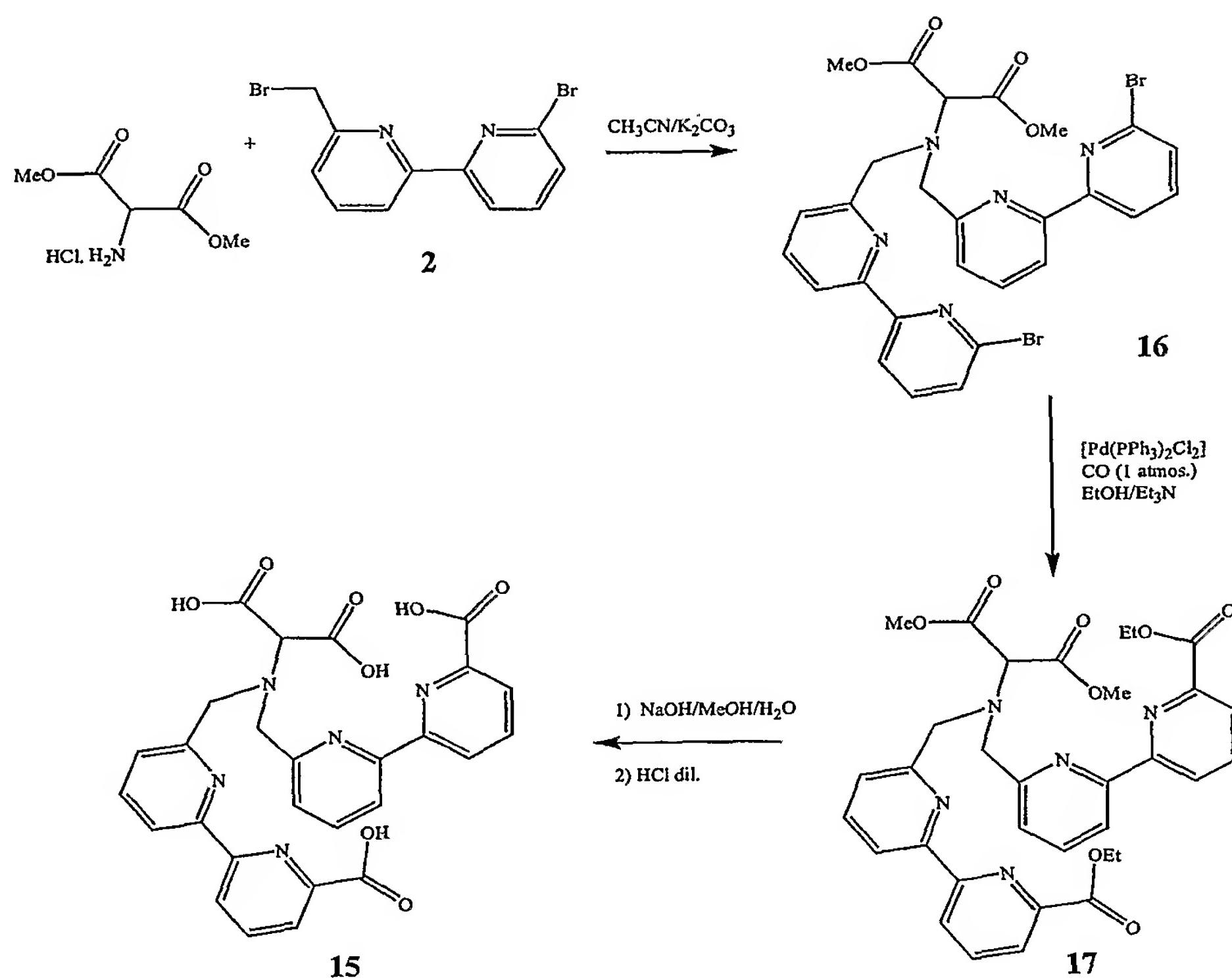


Dans un ballon de 50 mL équipé d'un réfrigérant, 19 mg (22 µmol) de composé 12 sont dissous dans 35 mL d'eau. Le pH est ajusté à 3,1 avec une solution de HCl dilué. A cette 10 solution on ajoute 9 mg (25 µmol) de  $EuCl_3 \cdot 6H_2O$  dissous dans 5 mL d'eau. La solution est chauffée à 80°C pendant une heure. Après refroidissement la solution est filtrée sur célite et le pH est remonté à 7,1 avec une solution à 0,5% de NaOH dans l'eau. La solution est évaporée à sec, le 15 produit précipite dans un mélange  $H_2O/THF$ . Le solide jaune pâle est isolé par centrifugation puis séché sous vide, et l'on obtient 9 mg (10 µmol) de complexe 14 (correspondant à un rendement de 47%) dont les caractéristiques sont les suivantes :  
 20 FAB<sup>+</sup>/MS : 848,2 ( $[14-H_2O-Na]^+$ , 35%).

**Exemple 13**  
**Préparation du composé 15**



Ce composé est obtenu en trois étapes selon le schéma synthétique suivant:



Préparation du composé 16

Dans un ballon de Schlenk de 500 mL sous atmosphère d'argon, on introduit 450 mg (2,13 mmol) de sels d'hydrochlorure de diéthylaminomalonate et 1,18 g (8,54 mmol) de  $K_2CO_3$  dans 150 mL d'acetonitrile fraîchement

distillée. La solution est chauffée à 80°C pendant une heure. On ajoute 1,46 g (4,45 mmol) de composé 2 et on chauffe pendant 21 heures à 80°C. La solution est évaporée à sec et le résidu est redissous avec 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et 20 mL d'eau. La phase aqueuse est lavée avec deux portions de 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et la somme des phases organiques est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée à sec. Le résidu solide est purifié par chromatographie flash sur silice ( $\phi=4$  cm, h=14 cm) avec un mélange de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (100/0 à 99/1) comme éluant. On obtient 794 mg (1,19 mmol) de composé 16 (correspondant à un rendement de 56%) sous forme de poudre jaune pâle qui présente les caractéristiques suivantes :

$R_f = 0,57$ , SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (97/3).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) :  $\delta$  1,26 (t, 6H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 4,22 (s, 4H), 4,23 (q, 4H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 4,47 (s, 1H), 7,43 (dd, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz, <sup>4</sup>J=0,5 Hz), 7,60 (t, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 7,62 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 7,75 (t, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 8,22 (dd, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz, <sup>4</sup>J=1,0 Hz), 8,37 (dd, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz, <sup>4</sup>J=1,0 Hz).  
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) :  $\delta$  14,1, 58,0, 61,4, 67,1, 119,7, 123,4, 127,7, 137,4, 139,0, 141,4, 153,5, 157,4, 158,9, 168,1.

Analyses calculées pour C<sub>29</sub>H<sub>27</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> : C 52,04, H 4,07, N 10,46. Trouvées : C 51,93, H 3,93, N 10,31.

FAB<sup>+</sup>/MS : 670,2 (100%), 672,2 (50%), [16+H]<sup>+</sup>.

## 25 Préparation du composé 17

Dans un ballon bicol de 250 mL on introduit 778 mg (1,16 mmol) de composé 16 et 82 mg (0,12 mmol) de [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] dans 75 mL d'éthanol et 75 mL de triéthylamine. La solution est chauffée à 70°C pendant 16 heures en faisant barboter un flux de CO. La solution est évaporée à sec, le solide obtenu est redissous dans 75 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtré sur célite, puis la phase organique est lavée avec 15 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite avec deux portions de 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et l'ensemble des phases organiques est séché sur MgSO<sub>4</sub>, filtré puis évaporé à sec. Le résidu est purifié par chromatographie flash sur silice ( $\phi=3$  cm, h=16 cm) avec un mélange de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99,5/0,5 à 90/10)

comme éluant. Les fractions contenant le composé 17 avec de l'oxyde de triphénylphosphine sont dissoutes dans 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et extraites avec quatre portions de HCl 3N. Les phases aqueuses combinées sont neutralisées avec NaOH puis extraites avec trois portions de 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. L'ensemble des phases organiques est séché sur MgSO<sub>4</sub>, filtré puis évaporé à sec. On obtient 522 mg (0,80 mmol) de composé 17 sous forme d'une huile incolore (correspondant à un rendement de 68%), qui présente les caractéristiques suivantes :

10 R<sub>f</sub> = 0,55, SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (90/10).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) : δ 1,26 (t, 6H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 1,45 (t, 6H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 4,23 (q, 4H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 4,24 (s, 4H), 4,47 (q, 4H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 4,48 (s, 1H), 7,64 (dd, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz, <sup>4</sup>J=0,5 Hz), 7,80 (t, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 7,91 (t, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 15 8,09 (dd, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz, <sup>4</sup>J=1,0 Hz), 8,40 (dd, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz, <sup>4</sup>J=0,5 Hz), 8,62 (dd, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz, <sup>4</sup>J=1,5 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) : δ 14,1, 14,3, 58,0, 61,4, 61,8, 67,1, 120,0, 123,4, 124,2, 124,7, 137,5, 137,7, 147,7, 154,4, 156,5, 158,8, 165,3, 168,2.

20 Analyses calculées pour C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> : C 64,11, H 5,69, N 10,68. Trouvées : C 63,81, H 5,43, N 10,43.

FAB<sup>+</sup>/MS : 496,2 (35%), 656,1 ([17+H]<sup>+</sup>, 100%).

#### Préparation du composé 15

Dans un ballon de 50 mL équipé d'un réfrigérant, 103 mg (0,16 mmol) de composé 17 et 50 mg (1,25 mmol) de NaOH sont dissous dans un mélange de 10 mL de MeOH et 5 mL d'eau. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 5 heures. La solution est évaporée à sec et le solide est dissous dans 8 mL d'eau sur lesquels on ajoute lentement à 0°C une solution de HCl 1N jusqu'à ce que le produit précipite massivement (pH=4-5). Le précipité est isolé par centrifugation et séché sous vide. On obtient 59 mg (0,08 mmol) de chlorhydrate hydraté 15.3HCl (correspondant à un rendement de 53%) sous forme de poudre blanche dont les caractéristiques sont les suivantes :

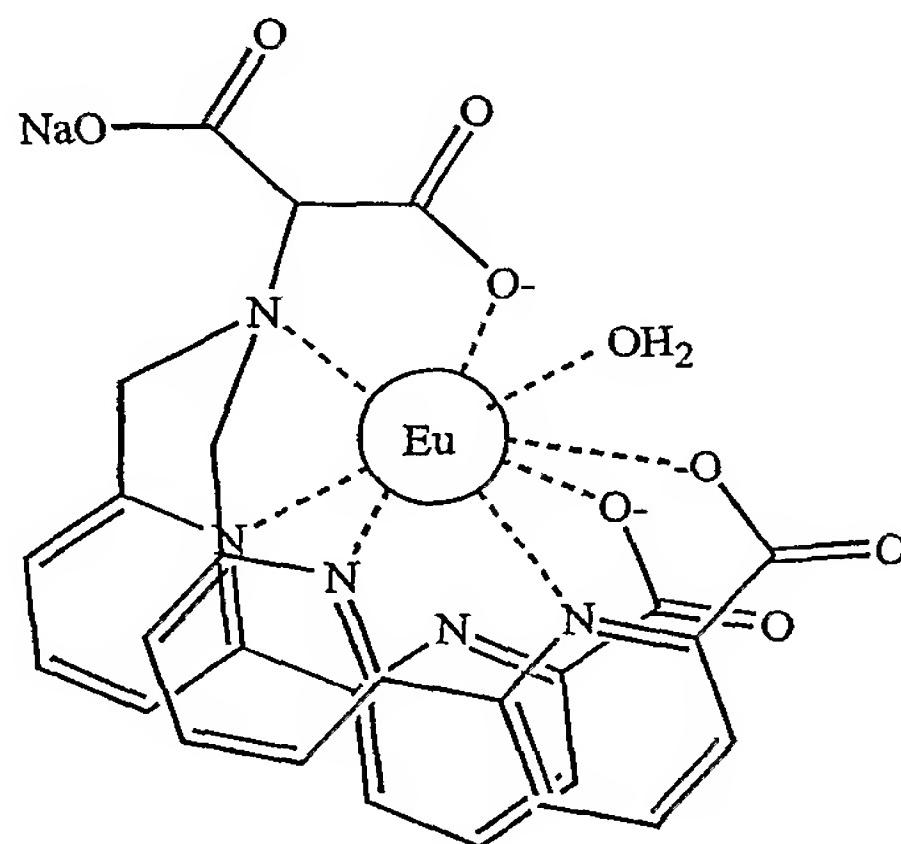
35 <sup>1</sup>H-RMN (NaOD/<sup>t</sup>BuOH, 300 MHz) : δ 3,75 (s, 4H), 4,04 (s, 1H), 6,84 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 7,15-7,26 (m, 4H), 7,32 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 7,42 (t, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 7,56 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (NaOD/tBuOH, 75 MHz) : δ 60,3, 79,4, 119,9, 122,9, 124,1, 124,4, 138,2, 138,6, 152,8, 153,7, 154,0, 158,7, 168,6, 172,3, 177,3.

Analyses calculées pour C<sub>27</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>.3HCl.3H<sub>2</sub>O: C 45,87, H 4,28,  
5 N 9,91. Trouvées : C 45,75, H 4,09, N 9,78.  
FAB<sup>+</sup>/MS : 544,2 ([15+H]<sup>+</sup>, 20%).

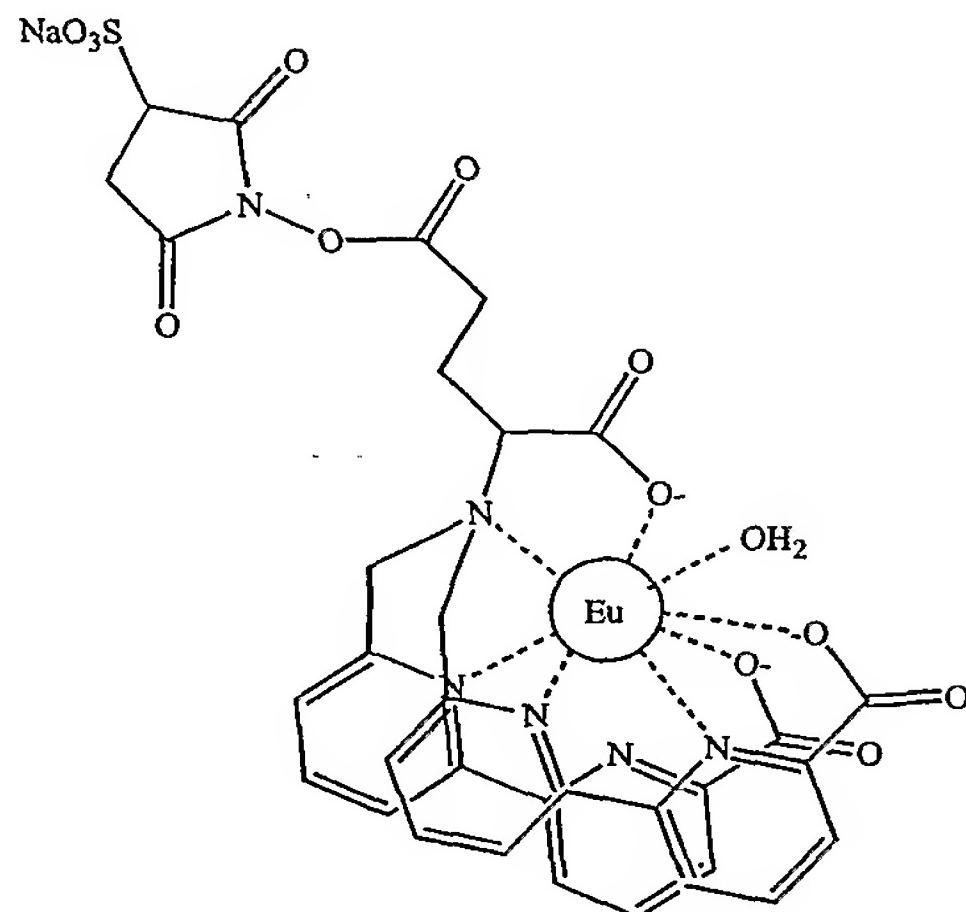
#### Exemple 14

##### Préparation du complexe 18 de formule



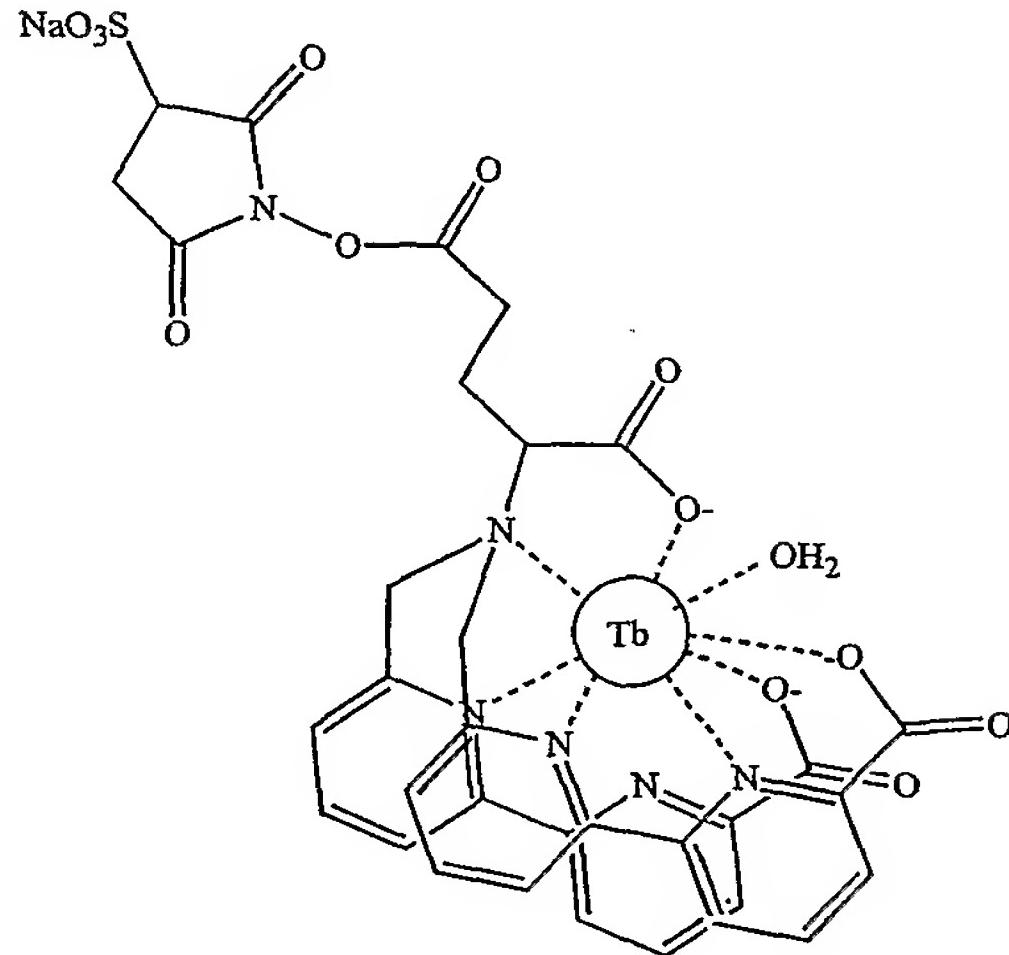
10 Dans un ballon de 10 mL, 15 mg de 15.3HCl.3H<sub>2</sub>O (21 μmol) sont dispersés dans un mélange de 10 mL de MeOH et de 10 mL d'eau. A cette solution est ajouté 10 mg (27 μmol) de EuCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O dissous dans 5 mL de MeOH et 5 mL d'eau. La solution est chauffée à 70°C pendant une heure. Après  
15 refroidissement le pH de la solution est remonté à 7,3 avec une solution à 0,5% de NaOH dans l'eau. La solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à apparition d'un précipité. Le solide blanc est isolé par centrifugation puis séché sous vide pour donner 14 mg (19 μmol) de composé 18  
20 (correspondant à un rendement de 90%) dont les caractéristiques sont les suivantes :  
FAB<sup>-</sup>/MS : 692,3 ([18-H<sub>2</sub>O-Na])<sup>-</sup>, 100%.  
IR (pastille de KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3442, 1626, 1588, 1460, 1411, 1373.

**Exemple 15**  
**Préparation du complexe 19 de formule :**

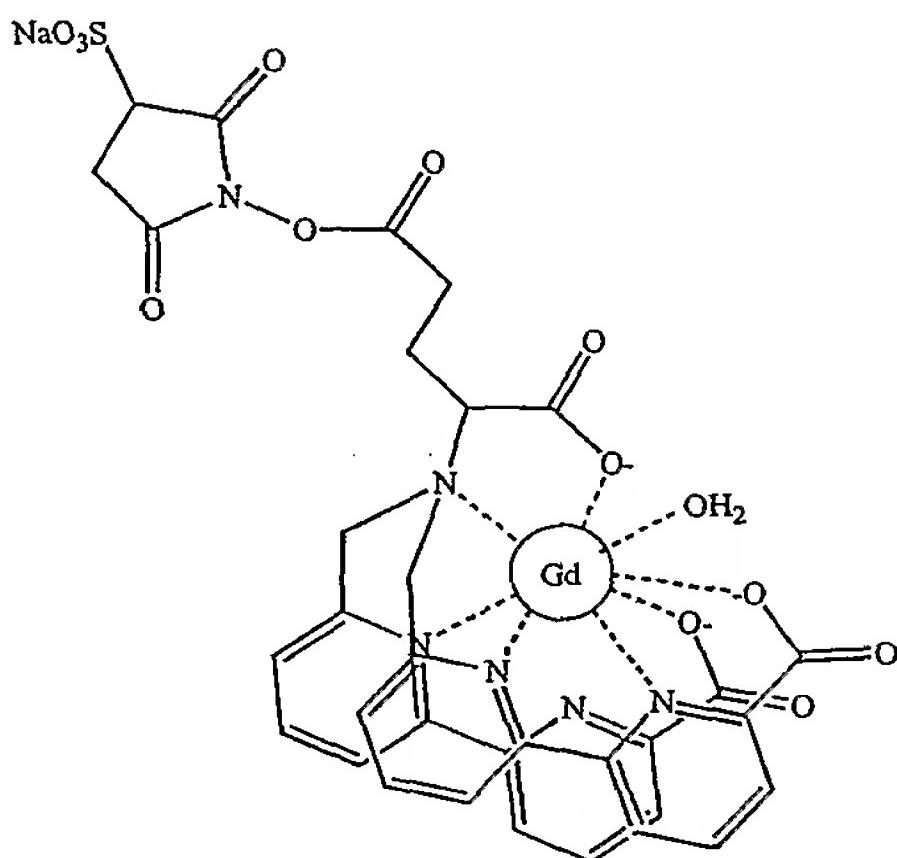


Dans un ballon de 10 mL, 18 mg (22 µmol) de complexe 5  
 5 sont mis en suspension dans 5 mL de DMSO. A cette solution  
 on ajoute 6 mg (26 µmol) de sel monosodique de N-hydroxy-  
 succinimide-3-acide sulfonique hydraté et 5 mg (26 µmol) de  
 chlorhydrate d'éthyle-N,N-diméthyle-3-aminopropyle-carbo-  
 diimide (EDCI.HCl). La solution est agitée à température  
 10 ambiante pendant 46 heures durant lesquelles le complexe 5  
 se dissout. L'ajout de THF à la solution provoque la  
 formation d'un précipité que l'on récupère par centrifuga-  
 gation. On obtient 15 mg (15 µmol) de complexe 19 (corres-  
 pondant à un rendement de 68%) sous forme de poudre blanche.

**Exemple 16**  
**Préparation du complexe 20 de formule :**



Dans un ballon de 50 mL, 45 mg (55 µmol) de complexe 8 sont mis en suspension dans 10 mL de DMSO. A cette solution on ajoute 14 mg (60 µmol) de sel monosodique de N-hydroxy-succinimide-3-acide sulfonique hydraté et 12 mg (63 µmol) de chlorhydrate d'éthyle-N,N-diméthyle-3-aminopropyle-carbodiimide (EDCI.HCl). La solution est agitée à température ambiante pendant 92 heures durant lesquelles le complexe 8 se dissout. L'ajout de THF à la solution provoque la formation d'un précipité que l'on récupère par centrifugation. On obtient 45 mg (44 µmol) de complexe 20 (correspondant à un rendement de 81%) sous forme de poudre jaune dont les caractéristiques sont les suivantes :  
 Analyses calculées pour  $C_{33}H_{24}N_6NaO_{13}STb \cdot 5H_2O$  : C 38,99, H 3,37, N 8,27. Trouvées : C 39,20, H 3,56, N 8,39.  
 FAB<sup>+</sup>/MS : 682,2 ( $[20-H_2O-C_5H_3NNaO_7S]^+$ , 95%), 727,2 ( $[20-H_2O-C_4H_3NNaO_5S+H]^+$ , 55%).

**Exemple 17****Préparation du complexe 21 de formule :**

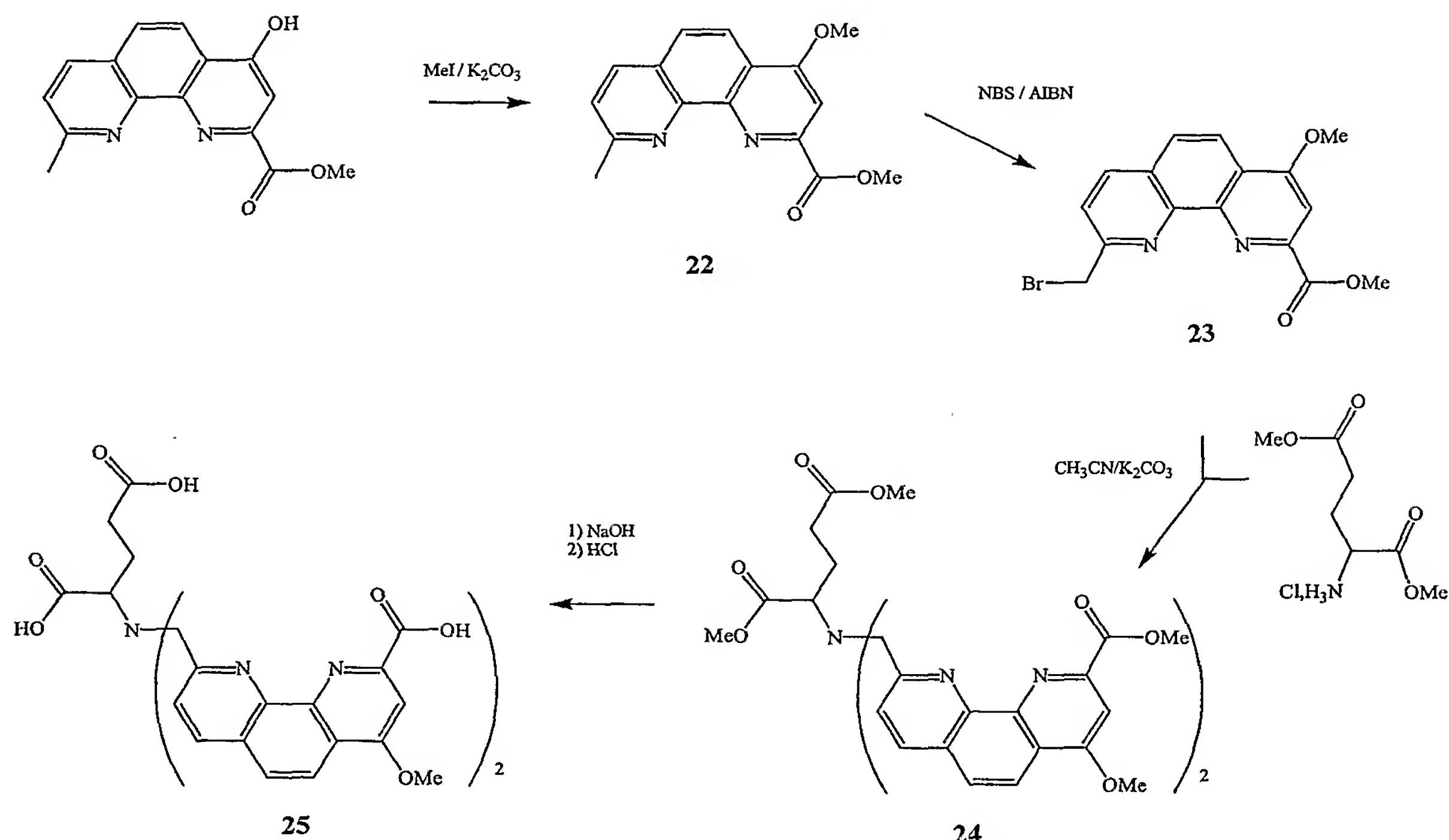
Dans un ballon de 10 mL, 19 mg (24 µmol) de complexe 10 sont mis en suspension dans 5 mL de DMSO. A cette solution on ajoute 7 mg (30 µmol) de sel monosodique de N-hydroxysuccinimide-3-acide sulfonique hydraté et 5 mg (26 µmol) de chlorhydrate d'éthyle-N,N-diméthyle-3-aminopropyle-carbodiimide (EDCI.HCl). La solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures durant lesquelles le complexe 10 se dissout. L'ajout de THF à la solution provoque la formation d'un précipité que l'on récupère par centrifugation. On obtient 19 mg (19 µmol) de complexe 21 (correspondant à un rendement de 80%) sous forme de poudre jaune dont les caractéristiques sont les suivantes :

FAB<sup>+</sup>/MS : 681,2 ([21-H<sub>2</sub>O-C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>NNaO<sub>7</sub>S]<sup>+</sup>, 100%), 726,3 ([21-H<sub>2</sub>O-C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>NNaO<sub>5</sub>S+H]<sup>+</sup>, 40%).

**Exemple 18****Préparation du compose 25**

Le compose 25 est obtenu en quatre étapes selon le schéma suivant:

36



## Préparation du composé 22

Dans un tube de Schlenk sous atmosphère d'argon, on introduit 2,04 g (7,6 mmol) de 7-hydroxy-9-carbométhoxy-2-méthyl-phénanthroline (obtenu selon Heindel, N. et al, J. Heterocycl. Chem. 1968, 5, 869), 2,11 g (15,2 mmol) de  $K_2CO_3$  et 950  $\mu L$  (15,3 mmol) d'iodure de méthyle dans 60 mL d'acétonitrile fraîchement distillée sur  $P_2O_5$ . La solution est chauffée à 80°C pendant 19 heures. La solution est évaporée à sec, le résidu est dissous dans 100 mL de  $CH_2Cl_2$  et 15 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite avec 4 portions de 15 mL de  $CH_2Cl_2$  et la somme des phases organiques est séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée, puis évaporée à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur alumine ( $\phi=5$  cm, h=12 cm) avec un mélange de  $CH_2Cl_2/MeOH$  (99/1) comme éluant. On obtient 2,05 g (7,3 mmol) de composé 22 (correspondant à un rendement de 95%) sous forme de poudre jaune qui présente les caractéristiques suivantes :

$R_f = 0,54$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98/2).

20  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) :  $\delta$  2,91 (s, 3H), 4,06 (s, 3H), 4,12 (s, 3H), 7,47 (d, 1H,  $^3J=8,5$  Hz), 7,77 (d, 1H,  $^3J=9,0$  Hz),

7,83 (s, 1H), 8,08 (d, 1H,  $^3J=7,5$  Hz), 8,12 (d, 1H,  $^3J=9,0$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) :  $\delta$  25,8, 52,8, 56,2, 102,9, 118,7, 122,2, 123,9, 126,9, 127,4, 136,0, 145,2, 146,1, 148,6, 160,1, 163,2, 166,5.

Analyses calculées pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$  : C 68,07, H 5,00, N 9,92. Trouvées : C 67,92, H 4,93, N 9,78.

FAB $^+$ /MS : 283,2 ([22+H] $^+$ , 100%).

#### Préparation du composé 23

Dans un ballon de 250 mL, on introduit 1 g (3,5 mmol) de composé 22, 630 mg (3,5 mmol) de N-bromosuccinimide et 30 mg (0,2 mmol) d'azo-bis-isobutyronitrile (AIBN) dans 10 mL de benzène. La solution est irradiée pendant 30 minutes avec une lampe halogène standard de 100 W. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur alumine contenant 10% d'eau avec un mélange de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /hexane (50/50) comme éluant. On obtient 468 mg (1,3 mmol) de composé 23 (correspondant à un rendement de 37%) sous forme de poudre grise qui présente les caractéristiques suivantes :

$R_f$  = 0,71,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98/2).

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) :  $\delta$  4,06 (s, 3H), 4,12 (s, 3H), 4,93 (s, 2H), 7,77 (d, 1H,  $^3J=9,0$  Hz), 7,83 (s, 1H), 7,87 (d, 1H,  $^3J=8,5$  Hz), 8,17 (d, 1H,  $^3J=9,0$  Hz), 8,21 (d, 1H,  $^3J=8,5$  Hz).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) :  $\delta$  34,6, 53,0, 56,3, 103,3, 120,2, 122,4, 123,7, 127,0, 128,1, 137,1, 144,5, 145,9, 148,9, 157,6, 163,3, 166,2.

Analyses calculées pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_3$  : C 53,21, H 3,63, N 7,76. Trouvées : C 52,94, H 3,26, N 7,51.

FAB $^+$ /MS : 281,2 ([23-Br] $^+$ , 30%), 361,2 (100%), 363,2 (100%), [23+H] $^+$ .

#### Préparation du composé 24

Dans un tube de Schlenk sous atmosphère d'argon, on introduit 96 mg (0,45 mmol) de chlorhydrate du diméthyle ester de l'acide DL-glutamique et 250 mg (1,81 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  dans 15 mL d'acetonitrile fraîchement distillée sur  $\text{P}_2\text{O}_5$ . La

solution est chauffée à 80°C pendant 10 minutes. On ajoute 360 g (1 mmol) de composé 23 et on chauffe pendant 18 heures à 80°C. On ajoute une nouvelle portion de composé 23 (52 mg, 0,14 mmol) et on chauffe pendant 24 heures à 80°C. La solution est évaporée à sec, le résidu est dissous dans 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et 10 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite avec 4 portions de 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et la somme des phases organiques est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur alumine contenant 10% d'eau avec un mélange de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (100/0 à 99,3/0,7) comme éluant. On obtient 46 mg (0,06 mmol) de composé 24 (correspondant à un rendement de 37%) qui présente les caractéristiques suivantes :

*R<sub>f</sub>* = 0,16, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98/2).

15 <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) : δ 2,17-2,28 (m, 2H), 2,61 (t, 2H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 3,44 (s, 3H), 3,71 (t, 1H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 3,83 (s, 3H), 4,06-4,19 (m, 12H), 4,45-4,70 (m, 4H), 7,82 (d, 2H, <sup>3</sup>J=9,0 Hz), 7,86 (s, 2H), 8,13 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8,0 Hz), 8,18 (d, 2H, <sup>3</sup>J=9,0 Hz), 8,24 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8,5 Hz).

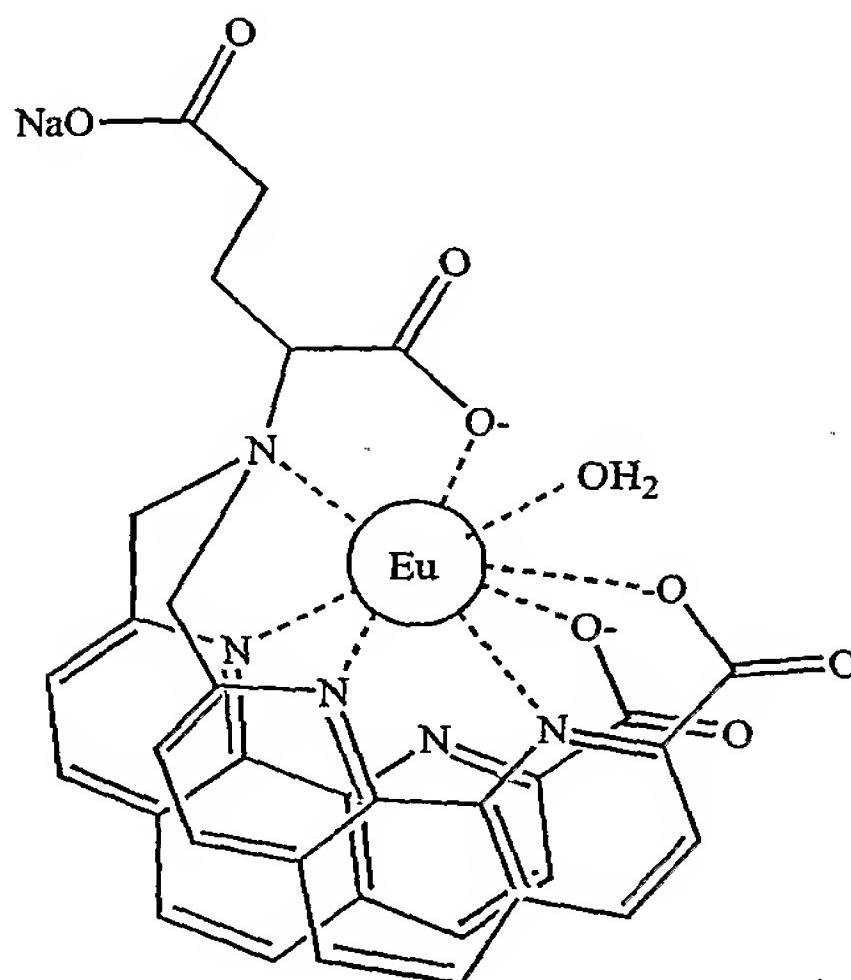
20 Préparation du composé 25.3HCl

Dans un ballon de 50 mL, 46 mg (0,06 mmol) de 24 et 10 mg (0,25 mmol) de NaOH sont dissous dans un mélange de 9 mL de MeOH et 3 mL d'eau. Le mélange est chauffé à 75°C pendant 21 heures. Les solvants sont évaporés sous pression réduite, le solide est dissous dans 5 mL d'eau et la solution obtenue est filtrée sur célite. Le milieu est acidifié avec une solution diluée d'acide chlorhydrique et la solution est évaporée à sec. Le résidu est lavé avec 2 portions de 2 mL d'eau. On obtient 19 mg (0,02 mmol) de chlorhydrate 30 25.3HCl (correspondant à un rendement de 39%) sous forme de poudre jaune-orange dont les caractéristiques sont les suivantes :

<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz) : δ 2,38-2,52 (m, 2H), 2,84 (t, 2H, <sup>3</sup>J=7,0 Hz), 4,17 (t, 1H, <sup>3</sup>J=7,5 Hz), 4,35 (s, 6H), 4,81-4,85 (m, 4H), 7,87 (d, 2H, <sup>3</sup>J=9,5 Hz), 7,89 (s, 2H), 8,16 (d, 2H, <sup>3</sup>J=9,0 Hz), 8,18 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8,5 Hz), 8,65 (d, 2H, <sup>3</sup>J=9,0 Hz).

**Exemple 19**

**Préparation du composé 26 de formule [Eu.(25-4H).H<sub>2</sub>O]Na**



Dans un ballon de 50 mL, 19 mg de 25.3HCl (24 µmol)  
 5 sont dissous dans un mélange de 15 mL de MeOH et de 15 mL d'eau. A cette solution est ajouté 10 mg (27 µmol) de EuCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O dissous dans 2,5 mL de MeOH et 2,5 mL d'eau. La solution est chauffée à 70°C pendant une heure. Après refroidissement le pH de la solution est remonté à 7,0 avec  
 10 une solution à 0,5% de NaOH dans l'eau. La solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à apparition d'un léger trouble, puis on ajoute du THF jusqu'à la formation  
 15 d'un précipité. Le solide jaune est isolé par centrifugation puis séché sous vide pour donner 7 mg (8 µmol) de composé 26 (correspondant à un rendement de 33%) dont les caractéristiques sont les suivantes :  
 FAB<sup>-</sup>/MS : 791,2 (30%), 828,2 ([26-H<sub>2</sub>O-Na])<sup>-</sup>, 50%.

**Exemple 20**

**Marquage d'un anticorps anti-digoxigénine par le complexe 9 et caractérisation par spectrométrie de masse.**

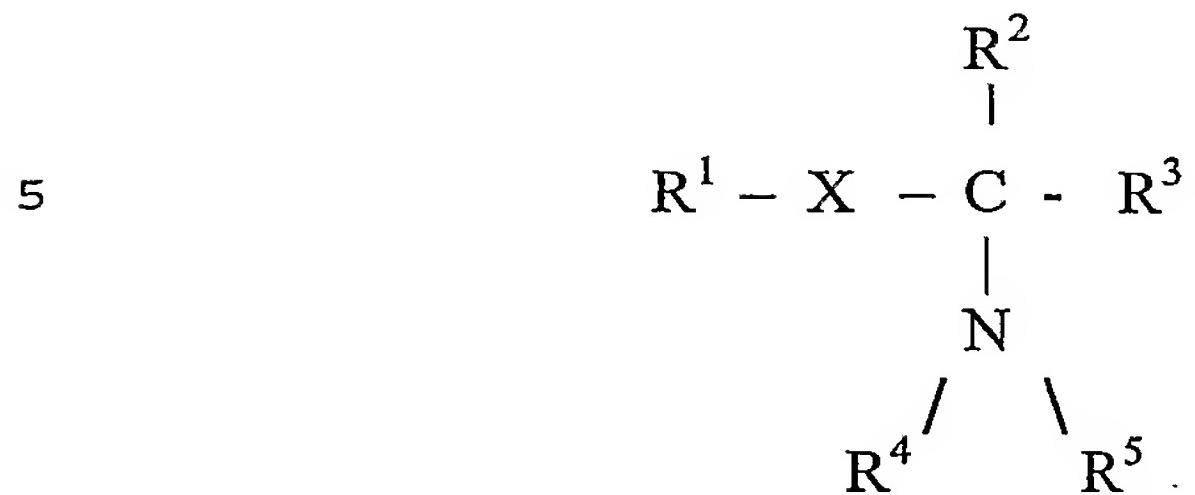
0,5 mg de complexe 9 sont ajoutés à une solution d'anticorps anti-digoxigénine contenant 1,0 mg d'anticorps dissous dans 500 µL de solution tampon (tampon borate 50 mM, pH = 7.0), correspondant à un rapport 9/anticorps de 30:1.  
 25 La solution est agitée à température ambiante pendant 24

heures, puis l'anticorps marqué est purifié selon la procédure décrite dans l'exemple 5 et stocké à 4°C.

La caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF est effectuée selon la procédure décrite dans l'exemple 5,  
5 conduisant à une masse de 49220 Da pour l'anticorps marqué (47880 Da pour l'anticorps libre), soit un taux de greffage de 2,5.

**Revendications.**

1. Composé répondant à la formule (I)



10 dans laquelle

- $R^1$  est un groupe fonctionnel capable de réagir avec les fonctions présentes sur les protéines, les anticorps ou sur des matériaux minéraux ou organiques ;
- $X$  représente une simple liaison ou une chaîne hydrocarbonée constituée par au moins un groupe choisi parmi les groupes alkylènes et les groupes alkénylènes qui comprennent éventuellement au moins un hétéroatome, et parmi les groupes arylènes ;
- $R^2$  est un groupement anionique à pH neutre  $A^2$  ou un groupe alkylène ou alkénylène ayant de 1 à 4 atomes de carbone et portant au moins un tel groupement  $A^2$ , ledit groupe alkylène ou alkénylène comprenant éventuellement au moins un hétéroatome dans la chaîne ;
- $R^3$  représente H ou un groupe alkylène ou alkénylène ayant de 1 à 5 atomes de carbone et contenant éventuellement au moins un hétéroatome dans la chaîne, ledit groupe portant éventuellement au moins un groupement anionique à pH neutre  $A^3$  ;
- $R^4$  est choisi parmi les groupements répondant à la formule  $-(C)_n-C-Z^1-C-C-Z^2-C-A^4$  dans laquelle  $n$  est égal à 1 ou 2,  $Z^1$  et  $Z^2$  représentent chacun un hétéroatome choisi parmi O et N, l'un au moins étant un atome d'azote qui fait partie d'un hétérocycle aromatique avec les deux atomes de carbone qui l'entourent, et  $A^4$  est un groupe qui est anionique à pH neutre dans lequel l'atome portant la charge anionique est en position  $\gamma$  par rapport à  $Z^2$  ;
- $R^5$  est choisi parmi les groupements définis pour  $R^4$  ou parmi les groupements qui répondent à la formule

-C-C-E<sup>1</sup>-C-C-E<sup>2</sup>-C-A<sup>5</sup> dans laquelle E<sup>1</sup> et E<sup>2</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre un hétéroatome choisi parmi O et N, et A<sup>5</sup> est un groupe anionique à pH neutre dans lequel l'atome portant la charge anionique est en position  $\gamma$  par rapport à E<sup>2</sup>.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substituant R<sup>1</sup> est choisi parmi groupes amino, thio, cyano, isocyano, acridinyle, hydrazino, halogénoacétate, anhydride, triazo, carbonyle, nitrobenzoyle, sulfonyle, thionyle, halogénure, époxyde, aldéhyde, imidazole, hydroxyphényle, mercapto, ester N-succinimique, ester N-sulfosuccinimique, maléimido, hydroxyle, carboxyle, thiocyanato, et isothiocyanato.

3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substituant R<sup>2</sup> est un groupe A<sup>2</sup> anionique à pH neutre.

4. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substituant R<sup>3</sup> est H ou un alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>3</sub>.

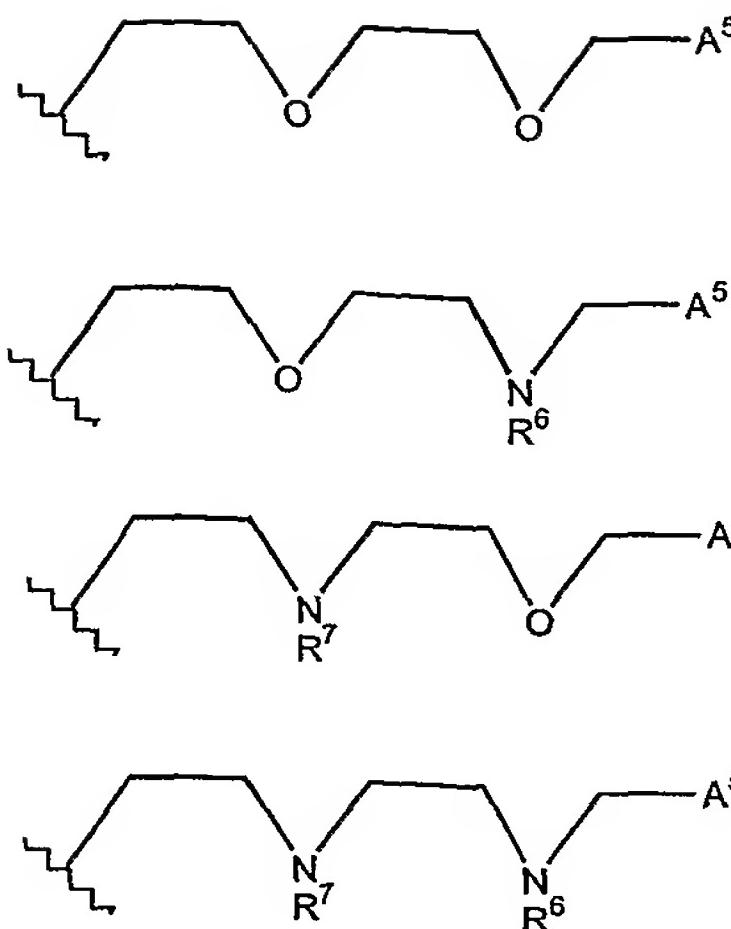
5. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les groupes Z<sup>1</sup> et Z<sup>2</sup> de R<sup>4</sup> font partie d'un groupe hétérocyclique aromatique.

6. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que n est égal à 1.

7. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'un des segments -C-Z<sup>1</sup>-C- ou -C-Z<sup>2</sup>-C- fait partie d'un groupe hétérocyclique choisi parmi les groupes pyridyle, pyrimidinyle, quinolyle et iso-quinolyle.

8. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le segment -C-Z<sup>1</sup>-C-C-Z<sup>2</sup>-C- est choisi parmi les groupes 2,2'-bipyridinyle, 1,10-phénanthrolinyle, 2,2'-bisquinolyle, 2,2'-bisisoquinolyle et 2,2'-bipyrimidinyle, lesdits groupes pouvant porter des substituants alkyle ou alkoxy sur au moins un atome de carbone d'un hétérocycle.

9. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R<sup>5</sup> est choisi parmi les groupements suivants :



dans lesquels  $\text{R}^6$  et  $\text{R}^7$  représentent des chaînes alkyles ayant de 1 à 5 atomes de carbone et contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes.

5 10. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que  $\text{R}^4$  et  $\text{R}^5$  sont identiques.

11. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les groupes anioniques à pH neutre  $\text{A}^2$ ,  $\text{A}^3$ ,  $\text{A}^4$  ou  $\text{A}^5$  sont choisis indépendamment les uns des autres parmi les 10 groupes  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{P}(\text{O})(\text{OR})\text{OH}$ ,  $-\text{P}(\text{O})\text{R(OH)}$  et  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ , dans lesquels R est un groupe alkyle ou un groupe aryle.

12. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est sous forme cationique, l'azote porteur des substituants  $\text{R}^4$  et  $\text{R}^5$ , ainsi qu'éventuellement les 15 hétéroatomes  $\text{Z}^1$ ,  $\text{Z}^2$ ,  $\text{E}^1$  et  $\text{E}^2$  se trouvant sous forme protonée.

13. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est sous forme anionique, les différents groupes  $\text{A}^i$  se présentant sous forme de sels.

20 14. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est sous forme zwitterionique, l'azote porteur des substituants  $\text{R}^4$  et  $\text{R}^5$ , ainsi qu'éventuellement les hétéroatomes  $\text{Z}^1$ ,  $\text{Z}^2$ ,  $\text{E}^1$  et  $\text{E}^2$  se trouvant sous forme protonée, et les différents groupes  $\text{A}^i$  se présentant sous 25 forme de sels.

15. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est un groupe arylène qui comprend un noyau

aromatique unique ou plusieurs noyaux aromatiques condensés ou non, le(s)dit(s) noyau(x) portant éventuellement un ou plusieurs groupements hydrocarbonés aliphatiques.

16. Composé selon la revendication 1, caractérisé en 5 ce que le groupement X est un groupement alkylène ou alkénylène, ayant de 1 à 10 atomes de carbone.

17. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le groupement X est groupement arylène ayant de 5 à 10 atomes de carbone.

10 18. Procédé de préparation d'un complexe de lanthanide, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un composé (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 avec un composé donneur de cation lanthanide.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en 15 ce que le composé donneur de cation lanthanide est choisi parmi les halogénures de lanthanide hydratés, les nitrates de lanthanide hydratés, les carbonates de lanthanide et les triflates de lanthanide.

20. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en 20 ce que la réaction est effectuée en solution dans un solvant choisi parmi l'eau, le méthanol, l'éthanol ou l'acetonitrile.

21. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'on fait réagir le composé (I) avec le précurseur de 25 l'ion lanthanide dans un mélange de méthanol et d'eau à un pH allant de 3 à 5, pendant une durée comprise entre 10 minutes et 24 heures, à une température comprise entre 25°C à 80°C, puis l'on ajuste le pH de la solution à 7,0 et on évapore le méthanol.

30 22. Complexe obtenu par un procédé selon la revendication 18, constitué par un ion lanthanide Ln complexé par un ligand qui répond à la formule (I).

23. Complexe selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'ion lanthanide est choisi parmi les ions europium, 35 terbium, samarium, dysprosium, erbium, ytterbium, néodyme et gadolinium.

24. Complexe selon la revendication 22, caractérisé en ce que le substituant  $R^4$  du composé (I) est  $-C-C-Z^1-C-C-Z^2-C-A^4$ , les 3 cycles chélates se formant entre le cation lanthanide et respectivement :

- 5 - l'atome N portant  $R^4$  et  $R^5$ ,  $Z^1$  et les atomes de carbone qui les séparent ;
- $Z^1$ ,  $Z^2$  et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- le segment terminal  $Z^2-C-A^4$ .

25. Complexe selon la revendication 24, caractérisé en 10 ce que le substituant  $R^5$  est du même type que le substituant  $R^4$ .

26. Complexe selon la revendication 24, caractérisé en ce que le substituant  $R^5$  est du type  $-C-C-E^1-C-C-E^2-C-A^5$ , 3 cycles chélates à 5 membres se formant entre le cation 15 lanthanide et respectivement :

- l'atome N portant  $R^4$  et  $R^5$ ,  $E^1$  et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- $E^1$ ,  $E^2$  et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- le segment terminal  $E^2-C-A^5$ .

20 27. Procédé pour l'analyse quantitative ou qualitative d'un composé, caractérisé en ce qu'il consiste à lier de manière covalente audit composé, un marqueur constitué par un complexe selon l'une des revendications 25 à 29, et à déetecter ou quantifier la présence du composé marqué grâce 25 aux propriétés de luminescence du marqueur.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le complexe est un complexe d'europtium, de terbium, de samarium ou de dysprosium.

29. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en 30 ce que le substituant  $R^1$  du complexe est choisi parmi les groupes amino, thio et carboxyle ou parmi les groupes maléimido, ester N-succinimidique et isothiocyanato.

30. Agent de relaxation pour la résonnance magnétique nucléaire, constitué par un complexe selon l'une des 35 revendications 22 à 26.

31. Agent de relaxation selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'il est constitué par un complexe de gadolinium, d'europium ou de dysprosium.

32. Agent de relaxation selon la revendication 30,  
5 caractérisé en ce qu'il est constitué par un complexe dans lequel le substituant R<sup>1</sup> est choisi parmi les groupes amino, thio et carboxyle ou parmi les groupes maléimido, ester N-succinimidique et isothiocyanato.

1 / 1

Fig. 1

